

I DISORDINI IPERTENSIVI IN GRAVIDANZA: ASPETTI CLINICI, DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

Nonostante gli sforzi dei ricercatori e le molteplici ricerche cliniche pubblicate nel corso degli anni, molti aspetti della patologia ipertensiva in gravidanza appaiono ancora lontani dall'essere chiariti definitivamente e riguardano tanto aspetti di tipo etiologico-patogenetico, quanto aspetti diagnostici e di gestione clinica.

Dal punto di vista epidemiologico è stato riportato che nei Paesi ad economia avanzata il 10-20% delle gravidanze è complicato da una qualche forma di ipertensione (1). L'esatta incidenza della preeclampsia non è nota ma si ritiene che possa collocarsi attorno al 5-8% (2). La preeclampsia inoltre rappresenta la base del 15-20% dei casi di mortalità materna (3) e costituisce una delle cause principali di mortalità e morbilità perinatale.

Da non sottovalutare è anche il dato che vede la preeclampsia come un importante fattore di rischio per lo sviluppo a distanza di tempo, da parte della donna, di patologia cardiovascolare; in particolare le donne con preeclampsia ad esordio precoce o ricorrente, sono a rischio significativamente più alto di morte cardiovascolare anche in epoca pre- menopausale (4).

Si parla di ipertensione in gravidanza quando : la pressione arteriosa sistolica è \geq o = a 140 mmHg e la pressione arteriosa diastolica è \geq o = a 90 mmHg confermate da numerose rilevazioni a distanza di parecchie ore in un ambulatorio o day-hospital o dopo riposo in ospedale.

Il tentativo di classificare i disturbi ipertensivi della gravidanza è ormai datato da molti anni. La letteratura che riguarda la classificazione e la diagnosi dei disturbi ipertensivi in gravidanza è stata e rimane fonte di confusione per clinici e ricercatori.

La mancanza di consenso sulla terminologia da usare e sul modo di far diagnosi e di identificare i diversi tipi di ipertensione è motivo delle controversie su diversi aspetti di questa patologia (prognosi, gestione clinica, valutazione degli esiti). Le diverse scuole di pensiero hanno tuttavia ormai raggiunto un sostanziale accordo basato sull'evoluzione delle conoscenze fisiopatologiche delle differenti condizioni che si presentano clinicamente. Pertanto i diversi sistemi classificativi delle diverse società scientifiche (Federazione Internazionale Di Ginecologia E Ostetricia, Società Australiana, Americana) presentano poche differenze sostanziali

L'ISSHP (International society of hypertension in pregnancy) classifica l'ipertensione in gravidanza secondo tali categorie (5):

- Iipertensione gestazionale: riscontro di ipertensione dopo la 20° settimana in donne precedentemente normotese e non proteinuriche , generalmente reversibile entro 6-12 settimane dal parto
- Preeclampsia-eclampsia: riscontro di ipertensione e proteinuria e/o alterazioni associate , indicative di danno secondario e fortemente indicative di preeclampsia (trombocitemia, aumento LDH, alterazione della funzionalità epatica e renale, coagulopatia, epigastralgia, cefalea, ipereflessia, disturbi visivi, edema polmonare, ritardo di crescita fetale) dopo la 20° settimana in donne precedentemente normotese e non proteinuriche , generalmente reversibile entro 6-12 settimane dal parto
- Iipertensione cronica (essenziale o secondaria): ipertensione presente prima della gravidanza o comparsa prima della 20° settimana o ipertensione che non si risolve in puerperio
- Preeclampsia sovrapposta ad ipertensione cronica: comparsa “ex novo” di

proteinuria dopo la 20a settimana. Anche un improvviso aumento dei valori di pressione, la comparsa di piastrinopenia, l'elevazione delle transaminasi e, nelle donne che presentavano la proteinuria all'inizio della gravidanza, un improvviso aumento della proteinuria, fanno porre il sospetto di preeclampsia sovrainposta

C'è realmente una sola basilare differenza tra la classificazione americana ed australiana: la definizione di preeclampsia, che è più estesa ad una serie di segni clinici nella classificazione australiana, più ristretta al solo riscontro di elevazione della pressione e presenza di proteinuria nella classificazione americana.

L'ISSHP consiglia di aderire ai criteri americani della NHBPEP (National high blood pressure education program) (6), nell'attesa di ulteriori studi in grado di dimostrare che i più ampi criteri Australiani possano a pieno titolo essere adottati come momenti diagnostici.

Classicamente la classificazione della preeclampsia prevede la distinzione in forma lieve e severa (7-8) secondo criteri clinici e laboratoristici. La forma severa si riconosce in presenza di almeno uno dei seguenti segni o sintomi:

- Pressione arteriosa sistolica ≥ 160 e/o diastolica ≥ 110 mmHg in due misurazioni successive ad almeno 6 ore di distanza in condizioni di riposo.
- Proteinuria ≥ 5 g/24 ore, o a 3+ al dipstick in due campioni estemporanei di urine prelevati ad almeno 4 ore di distanza. La proteinuria eseguita con dipstick è utile come screening ma deve essere confermata con l'esame sulle urine delle 24 ore.
- Oliguria (diuresi < 500 ml/24 ore o < 80 ml/4 ore).
- Disturbi visivi (scotomi, visione offuscata, cecità mono- o bilaterale transitoria).
- Alterazioni neurologiche (cefalea intensa e persistente, iperreflessia a clono, segni di lato, parestesie, confusione mentale e disorientamento spazio-

temporale).

- Edema polmonare, cianosi.
- Epigastralgia e/o dolore ipocondrio destro.
- Aumento degli enzimi epatici.
- Conta piastrinica $< 100.000/mm^3$.
- Restrizione della crescita fetale

Una classificazione più recente che riflette una concezione moderna è la distinzione in forma early (< 34 settimane) and late onset (>34 settimane) (9) che hanno verosimilmente differente eziopatogenesi e di conseguenza differente espressione clinica. Vi sono 2 principali differenze tra i due gruppi:

La Late onset comprende l'80% di tutte le forme di preeclampsia e generalmente associata a :

- Normale crescita fetale
- Lievi o assenti modificazioni emodinamiche a livello di arterie spirali
- Assenti modificazioni a carico delle arterie ombelicali fetali
- Incremento del rischio di fattori che comportano incremento della massa /superficie placentare (diabete, gemellarità, anemia, altitudine)

La Early onset rappresenta invece dal 5 al 20% dei casi di preeclampsia, a seconda delle statistiche, ma comprende i casi più severi e pertanto rappresenta la forma su cui si concentrano maggiormente le ricerche cliniche. È tipicamente associata a:

- Inadeguata e incompleta invasione trofoblastica delle arterie spirali
- Modificazioni emodinamiche di arterie spirali e uterine con alterazioni flussimetriche
- Alterazioni flussimetriche delle arterie ombelicali fetali

- Restrizione della crescita fetale, con cui condivide i medesimi aspetti patogenetici di inadeguata placentazione, come verrà descritto in seguito. Tuttavia poiché esistono forme “pure” di restrizione della crescita fetale e preeclampsia esistono teorie moderne che tentano dimostrane alcune differenze da punto di vista dei meccanismi patogenetici sottesi

In questa breve introduzione sugli aspetti clinici verranno elencate le complicanze della patologia con lo scopo di sottolineare la rilevanza in termini di morbidità e mortalità materna rinunciando ad ogni tentativo di esaustività (7-8)

Complicanze materne acute a rischio di mortalità materno-fetale

- Eclampsia: complicanza neurologica specifica, legata a stato ipertensivo e disfunzione endoteliale, la cui fisiopatologia non è completamente nota , eccetto la condizione di reversibilità. Caratterizzata da stato convulsivo, si associa a alterazioni neuroradiologiche . Possibili effetti neurocognitivi a distanza
- coagulazione intravasale disseminata
- sindrome HELLP: l'acronimo fu coniato nel 1982 (Weinstein 1982) per descrivere una sindrome caratterizzata da emolisi, aumento degli enzimi epatici e diminuita conta piastrinica (Hemolysis, Elevated Liver enzyme levels and Low Platelet count), che si associa con frequenza alle altre complicanze elencate
- distacco di placenta
- edema polmonare, sindrome da distress renale
- insufficienza renale

Complicanze materne a lungo termine : ipertensione cronica; diabete mellito; patologia renale cronica; malattia coronarica; stroke; morte prematura

Complicanze fetali/neonatali acute: restrizione della crescita fetale (FGR); parto pretermine; ipossia/acidosi; morte perinatale.

Complicanze fetali/neonatali a lungo termine: malattia polmonare cronica; retinopatia legata alla prematurità; paralisi cerebrale; ritardo mentale; patologie nell'adulto (cardiovascolari, preeclampsia, diabete mellito).

FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio che predispongono alla comparsa della preeclampsia sono rappresentati da:

- Caratteristiche specifiche materne e fattori correlati al partner.
- Condizioni patologiche preesistenti.
- Fattori riguardanti la gravidanza in atto.
- Altri fattori.

CARATTERISTICHE MATERNE E FATTORI CORRELATI AL PARTNER

Età estreme

Il rischio di Preeclampsia sembra aumentare nelle donne al di sotto dei 20 anni e al di sopra dei 40 (10). In un nostro studio recentemente pubblicato (11) abbiamo evidenziato come la percentuale di donne con età > 40 anni era del 7% e in queste il rischio di disordini ipertensivi in gravidanza era maggiore di 3 volte

Il rischio dell'insorgenza di preeclampsia in una seconda gravidanza aumenta con l'aumentare dell'età e con l'aumentare dell'intervallo di tempo tra le gravidanze (12). Probabilmente in una donna giovane l'endotelio riesce meglio a contrastare lo stress infiammatorio associato allo stato gravidico (13).

Razza nera

La maggior incidenza nella razza nera è da attribuire fattori genetici che conducono ad un aumento del rischio di ipertensione (14). La presenza di notevole incidenza di

popolazione di razza nera sub-sahariana nelle nostre regioni non può prescindere da tali considerazioni (15)

Familiarità

Uno studio datato del 1961 evidenziò come l'incidenza della patologia preeclamptica risultava 4 volte maggiore nelle sorelle di donne che sviluppavano la patologia nella loro prima gravidanza rispetto a sorelle di donne con gravidanza fisiologica (16-17). In ogni caso vi è comune accordo che una storia familiare positiva per preeclampsia ne aumenti il rischio

Nulliparità/Primipaternità

La patologia preeclamptica è da considerarsi una malattia della prima gravidanza (17). Infatti il 75% delle pazienti preeclamptiche sono nullipare . La sua incidenza diminuisce progressivamente con l'aumentare della parità; tale effetto protettivo viene perso se la donna cambia partner. Robillard (18) infatti, suggerisce come il termine primigravida dovrebbe essere in realtà sostituito da "primipaternità". Un'ipotesi eziopatogenetica della preeclampsia ormai accreditata è il maladattamento immunologico. I principali dati a favore di questa ipotesi derivano dagli studi epidemiologici che mostrano come l'impatto nel cambiamento dei partners, la donazione di sperma e di ovociti (19) siano associati ad un'aumentata frequenza della preeclampsia. L'effetto protettivo dell'esposizione allo sperma nelle donne con storia di sesso orale e con rapporti liberi nel tempo senza metodi di barriera mostra un ridotto rischio di sviluppo della patologia preeclamptica. Gli uomini che sono stati padri nel corso di una gravidanza complicata da preeclampsia verosimilmente contribuiranno al rischio di sviluppo della stessa con una nuova partner. Tale

riscontro suggerisce come sia preminente il ruolo degli antigeni paterni nello sviluppo della preeclampsia (10).

Pregressa Preeclampsia

Madri con storia di preeclampsia nella loro prima gravidanza mostrano un rischio aumentato di sviluppare tale condizione nella loro seconda gravidanza. In uno studio norvegese, il rischio nella seconda gravidanza con il medesimo partner, era il 13.1% e 11.8% se il partner era diverso (20). Zhang e coll. (21) hanno evidenziato come la ricorrenza della preeclampsia fosse il 32% in donne normotese con pregressa preeclampsia.

Storia Mestruale

Uno studio recente pubblicato dalla Clinica di Udine ha evidenziato come le donne affette da irregolarità mestruale e dismenorrea fossero esposte a rischio maggiore di patologia ipertensiva in gravidanza. La correlazione può essere legata a comuni pathway di citochine regolanti la reattività vascolare (22)

CONDIZIONI PATOLOGICHE PREESISTENTI

Obesità , Insulinoresistenza, Diabete

L'obesità è considerata un fattore di rischio per lo sviluppo dei disordini ipertensivi in gravidanza . In un recente studio pubblicato nel 2011 il rischio di preeclampsia sembra essere da 2 a 4 volte maggiore nelle donne obese a seconda del grado di obesità e di incremento ponderale in gravidanza. (23) Ciò può essere dovuto allo stato di circolazione iperdinamica tipico di questa condizione (24), alla dislipidemia ed al conseguente aumento dello stress ossidativo citochino-mediato (18) e agli effetti

emodinamici diretti mediati dall'iperinsulinemia come l'aumentata attività del sistema nervoso simpatico e l'aumentato riassorbimento di sodio dai tubuli renali. La distribuzione del grasso corporeo nella porzione superiore del corpo (obesità centrale) risulta essere associata ad un evidente aumento del rischio della patologia preeclamptica. In particolare uno studio ha dimostrato come la circonferenza addominale >80 centimetri alla sedicesima settimana di gravidanza si associ ad un rischio relativo da 2 a 7 volte (25-26).

La prevenzione ed il trattamento dell'obesità sembrano ridurre il rischio di incidenza della preeclampsia.

Il metabolismo dei carboidrati risulta spesso alterato nelle pazienti preeclamptiche ed i livelli basali di insulina risultano elevati prima della manifestazione della malattia (27). La Sex Hormon Binding Globulin (SHBG) è una proteina prodotta dal fegato, che lega normalmente gli estrogeni e gli androgeni, ma viene inibita da livelli alti di insulina; pertanto bassi livelli di SHBG sono significativi di iperinsulinemia e conseguente insulinoresistenza. È stato quindi proposto il dosaggio della SHBG come marcatore di insulinoresistenza nella malattia cardiovascolare e nella patologia preeclamptica. L'Adiponectina è un'altra proteina i cui livelli plasmatici risultano inversamente proporzionali al grado di insulinoresistenza. Bassi livelli sierici di adiponectina sembrano aumentare il rischio di preeclampsia.

Con gli stessi meccanismi si riscontra un aumentato rischio di preeclampsia nelle donne diabetiche, affette da diabete gestazionale e/o pregravidico (28-30).

Nelle donne preeclamptiche affette da diabete di tipo 1 si sono riscontrati livelli di Hb glicata superiori prima e durante la gravidanza (31).

Iperensione Cronica e patologia renale

Donne affette da ipertensione cronica preesistente alla gravidanza mostrano un

aumentato rischio di sviluppare preeclampsia sovrainposta pari al 15-20% (6).

Trombofilia congenita

La trombofilia congenita è stata considerata rischio per preeclampsia. Negli ultimi 20 anni numerosi studi e metanalisi hanno evidenziato risultati contraddittori circa tale associazione (32).

I meccanismi patogenetici che possono essere alla base della stessa sono rappresentati dall'interferenza nella differenziazione trofoblastica, impianto placentare inadeguato, trombosi della vascolarizzazione placentare, stress ossidativo e disfunzione endoteliale materna; in particolare si ritiene che quest'ultima rappresenti il 'grilletto' scatenante le manifestazioni biologiche e cliniche della preeclampsia (23-34).

Se gli studi fino al 2002 hanno riportato un'associazione positiva, gli studi più moderni sembrano essere in controtendenza .

In contrasto con gli studi precedenti Khan e coll. (35) recentemente, in uno studio multicentrico di più di 5000 pazienti, non hanno riscontrato, un'associazione tra la mutazione del fattore V di Leiden e del gene per fattore II (protrombina), del polimorfismo C677T della MTHFR (Metiltetraidrofolato-reduttasi), dell'iperomocisteinemia e rischio di sviluppo di preeclampsia. Infatti la percentuale di pazienti trombofiliche era del 14% nel gruppo delle preeclamptiche vs il 21% dei controlli. La ridotta perfusione placentare che sta alla base della forma precoce e severa della preeclampsia sarebbe conseguenza, secondo questi autori, non di uno stato trombofilico ma di ridotti livelli plasmatici di folati che condurrebbero alla produzione di radicali liberi nella circolazione materna dando l'avvio alla manifestazione preeclamptica. Questo studio non ha comunque preso in considerazione i casi più rari di trombofilia come il deficit di proteina C; di proteina S

e di antitrombina III. Anche Kocher (36) non ha riscontrato associazione tra trombofilia congenita e preeclampsia severa. Una spiegazione può risiedere nel fatto che i risultati emersi dagli studi di fine anni '90 potevano essere influenzati da bias di riferimento o di selezione conducendo pertanto ad una sovrarappresentazione di casi isolati.

Khan e coll. (35) concludono il loro studio sostenendo l'esistenza di un'associazione casuale tra trombofilia e preeclampsia. Probabilmente lo stato trombofilico agirebbe da cofattore nella patogenesi della preeclampsia o ne accelererebbe il decorso .

Non bisogna inoltre ignorare l'ipotesi moderna che sottolinea come la preeclampsia possieda un'eziopatogenesi multifattoriale in cui non sembra coinvolto solo il genoma materno ma anche quello fetale (37).

In conclusione che vi sia una relazione tra trombofilia congenita ed acquisita e le forme di preeclampsia severa, ad esordio precoce e ricorrenti.

Rimane pertanto dibattuto se le donne con storia di preeclampsia severa debbano essere screenate per i fattori trombofilici e se si possano giovare di eparina a basso peso molecolare nelle gravidanze successive (32).

Anticorpi antifosfolipidi

Gli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) rappresentano un gruppo eterogeneo di immunoglobuline dirette contro differenti antigeni includendo la cardiolipina, fosfatidilserina (carica negativa), la fosfatidil colina e fosfatidiletanolamina (carica neutra). Il legame tra gli anticorpi ed i rispettivi antigeni è reso possibile solo quando tra i due si interpone la più importante proteina legante i fosfolipidi denominata β 2glicoproteina (38). La presenza di anticorpi antifosfolipidi è considerata una trombofilia acquisita caratterizzata da una combinazione di differenti manifestazioni cliniche includendo trombosi venosa ed arteriosa, trombocitopenia e complicanze

ostetriche quali aborto ricorrente, morte endouterina, restrizione della crescita fetale, distacco di placenta e preeclampsia. Inoltre lo stato di ipercoagulabilità caratteristico della gravidanza espone queste pazienti ad un elevato rischio di trombosi periferica. Il meccanismo di azione degli anticorpi anti-fosfolipidi risulta essere differente in vivo ed in vitro determinando, infatti, nel primo caso una diminuita produzione di prostaglandina I₂ (PGI₂), aumento del tromboassano A₂, interazione con l'Annessina V (ANEX V) e diminuita attivazione della proteina C. L'attività di tali anticorpi in vitro, invece, comporta un prolungamento dei tempi della coagulazione (PTT aumentato) ed attivazione del fattore X. In definitiva l'azione degli anticorpi antifosfolipidi determina l'attivazione dei meccanismi locali della coagulazione con formazione di microtrombi e danno al microcircolo (38). Sia gli anticorpi anti-fosfolipidi che il loro antigene β 2glicoproteina sono presenti contemporaneamente nel sangue senza formare complessi immuni. Questo meccanismo si verifica in quanto la β 2glicoproteina diventa antigenica per gli aPL solo quando è immobilizzata su una adeguata superficie carica negativamente in quanto tale legame sembra determinare delle modificazioni nella conformazione della proteina rivelando neoepitopi a cui gli aPL possono legarsi. Tale fenomeno sembra spiegare come pazienti con aPL positivi possano non mostrare alcun segno di malattia per anni e successivamente sviluppare fenomeni di trombosi periferica o morte fetale senza riscontrare cambiamenti nella concentrazione ematica dei livelli di aPL. La fosfatidilserina sembra essere la superficie su cui la β 2glicoproteina viene immobilizzata in vivo. Tale molecola è tuttavia abitualmente localizzata nella parte interna del doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare non mostrando, in tal modo, la superficie favorevole per l'immobilizzazione della β 2glicoproteina, rendendo così impossibile il legame con gli aPL. Nel momento in cui la superficie cellulare è attivata, in seguito ad un danno e/o apoptosi cellulare, la fosfatidilserina viene traslocata sulla superficie

esterna della membrana consentendo l'immobilizzazione della β 2glicoproteina che diventa antigenica per gli aPL. Il legame che si instaura tra gli anticorpi anti-fosfolipidi ed il loro antigene determina il danno vascolare locale responsabile delle manifestazioni cliniche della patologia. Durante la gravidanza il trofoblasto induce importanti rimodellamenti tissutali determinando l'esposizione della fosfatidilserina nella porzione esterna della membrana cellulare. L'invasione trofoblastica può pertanto essere un meccanismo alla base dell'attivazione degli aPL circolanti e tale fenomeno sembra spiegare l'elevata incidenza di pazienti con positività degli aPL che mostrano complicanze vascolari solo durante la gestazione

FATTORI RIGUARDANTI LA GRAVIDANZA IN ATTO

Gravidanza multipla

L'incidenza di preeclampsia in primigravide gemellari risulterebbe 4-5 volte maggiore rispetto a donne con gravidanza singola (39).

Altri fattori

Ulteriori fattori riguardanti la gravidanza in atto sono: infezioni del tratto urinario, anomalie strutturali congenite, idrope fetale, anomalie cromosomiche, mola idatiforme

ALTRI FATTORI

Malattia Paradontale

La malattia clinica parodontale è associata ad un aumentato rischio di sviluppo della preeclampsia indipendentemente dall'età materna, dalla razza e dal fumo. È stato suggerito un parallelismo tra le conseguenze fisiopatologiche della preeclampsia e l'aterosclerosi (40). Infatti l'aterosclerosi come la preeclampsia si associa a disfunzione endoteliale, che può essere determinata dallo stress ossidativo e dalla

conseguente perossidazione lipidica, iperlipidemia o iperomocisteinemia (41). La malattia parodontale è un'infezione cronica orale sostenuta da germi gram negativi che mostra un'associazione con l'aterosclerosi, eventi tromboembolici (42-43) ed ipercolesterolemia (44). Inoltre tali patogeni della cavità orale sono stati riscontrati nella placca ateromasica e sembrano giocare un ruolo nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi. La malattia parodontale potrebbe determinare una stimolazione infiammatoria cronica, promuovendo ed esacerbando l'aterogenesi e la trombogenesi e probabilmente potrebbe favorire, nelle donne in gravidanza, lo sviluppo della preeclampsia (45)

Altitudine

Alcune osservazioni suggeriscono come l'altitudine possa influenzare il rischio di preeclampsia; infatti le donne che vivono in altitudine presentano un aumento dell'incidenza di preeclampsia. I due aspetti patologici preminenti su cui agisce tale fattore sono la restrizione della crescita fetale e l'aumento della incidenza della preeclampsia. Zamudio suggerisce come l'altitudine sembri spostare il rischio individuale di preeclampsia a causa dell'impatto della stessa su sistemi fisiologici multipli nessuno dei quali preso singolarmente può essere identificato come l'elemento causale (46).

Fumo

Il fumo di sigaretta si associa ad una riduzione del 30-40% del rischio di preeclampsia (47). Il beneficio viene tuttavia annullato dagli effetti negativi che il fumo induce sulla crescita fetale, ma tale osservazione può essere di ausilio nello studio della fisiopatologia della patologia preeclamptica. Infatti, il benefico effetto del fumo potrebbe essere mediato dalla nicotina attraverso l'inibizione dell'IL2 e del

fattore di necrosi tumorale prodotto dalle cellule monocitarie (13).

Il ruolo dei fattori angiogenetici come il fattore di crescita placentare (PlGF), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) ed il recettore 1 solubile anti-angiogenico (soluble fms-like tyrosine kinase-1 or sFlt-1) sono stati oggetto di attenzione negli ultimi anni nella patogenesi della preeclampsia. Nello specifico, si sono riscontrati nelle pazienti preeclampatiche più bassi livelli plasmatici di PlGF e un aumento della concentrazione di sFlt-1. Il fumo di sigaretta sembrerebbe influenzare tali fattori angiogenetici diminuendo i livelli circolanti di sFlt-1 assumendo paradossalmente un ruolo protettivo nei riguardi della patologia preeclampatica (48-49).

EZIOPATOGENESI E FISIOPATOLOGIA

La preeclampsia è stata definita come “malattia delle teorie” poiché la sua eziologia è a tutt’oggi sconosciuta, comunque ritenuta multifattoriale.

Notevoli sono i lavori e gli sforzi in questo senso.

È comunemente accettato che sia la presenza della placenta e non del feto, responsabile dello sviluppo della preeclampsia. Sebbene la placenta giochi un ruolo cruciale nello sviluppo della preeclampsia, l’epoca d’inizio, la severità e la sua progressione significativamente dipendono anche dalla risposta materna ai fattori placentari (50).

Diversi sono gli elementi cardine che sono stati individuati negli ultimi anni: difetto di placentazione, disfunzione endoteliale, stress ossidativo, fattori immunologici-genetici.

DIFETTI NELLA PLACENTAZIONE

Il trofoblasto svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo della placenta emocoriale e nel mantenere una gravidanza fisiologica (51); sei giorni dopo il concepimento, durante lo stato di blastocisti, il trofoblasto è la prima linea cellulare a differenziarsi (50). Successivamente si verifica la divisione in citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto con formazione, tre settimane dopo il concepimento, di due subpopolazioni: il trofoblasto villosa e quello extravillosa. Durante la gravidanza fisiologica il processo di invasione del trofoblasto extravillosa a livello della decidua materna e della parte più interna del miometrio, determina cambiamenti fisiologici essenziali per il corretto proseguimento della gravidanza. Tali modificazioni riguardano le arterie spirali e consistono nella sostituzione della tunica muscolare della parete vasale con materiale fibrinoso frammisto a cellule originate dal trofoblasto invasivo (9,52). I

cambiamenti vascolari che ne risultano esitano in una sostanziale vasodilatazione con la formazione di un distretto a basse resistenze ed alta capacitanza, garantendo un'adeguata perfusione placentare e fetale. Inoltre l'assenza della componente vascolare muscolo-elastica rende il vaso non reattivo agli agenti vasostimolanti .

Il processo di rimodellamento delle arterie spirali riconosce diverse fasi delle quali solo alcune risultano essere direttamente dipendenti dall'invasione trofoblastica, mentre le altre sono correlate con il processo di decidualizzazione (53). La precoce decidualizzazione vascolare rappresenta *la conditio sine qua non* del successivo rimodellamento vascolare trofoblasto-correlato (9,52). Pijnenborg e coll. (54) suddividono le modificazioni delle arterie spirali in cinque fasi. Lo stadio più precoce del rimodellamento vascolare (FASE 1) è rappresentato dalla vacuolizzazione endoteliale e dal rigonfiamento di alcune cellule muscolari della tunica media. Tale fase rappresenta il rimodellamento vascolare indipendente dal trofoblasto ed invece correlato alla decidualizzazione. Nella fase successiva (FASE 2) si verifica una disorganizzazione della tunica media con ampliamento degli spazi intercellulari determinando un'alterazione e perdita della tunica muscolare. Le modificazioni in questo stadio sono dipendenti dall'invasione del trofoblasto nel tessuto stromale e perivascolare, il quale determina cambiamenti nella matrice extracellulare tramite la secrezione di specifici enzimi. La FASE 3 è caratterizzata dalla comparsa del trofoblasto endovascolare all'interno del lume vasale. In un secondo tempo il trofoblasto endovascolare viene incorporato nella parete vasale, processo che risulta essere accompagnato dalla deposizione di materiale fibrinoide (FASE 4). L'originale strato muscolare liscio e la tunica elastica sono sostituiti da tale materiale fibrinoso, mentre le cellule trofoblastiche intercalate conferiscono, per la loro distribuzione scarsamente organizzata, un aspetto a ragnatela.

L'ultimo stadio (FASE 5) è caratterizzato dalla riparazione endoteliale a volte

associata all'ispessimento intimale legato alla proliferazione delle cellule miointimali di origine materna.

Per lungo tempo si è ritenuto che alla base della manifestazione patologica vi sia un difetto di placentazione, ovvero che tale processo sia compromesso, insufficiente o superficiale. Ciò causerebbe uno stato di ipovascolarizzazione responsabile di un accentuato stress ossidativo e del danno endoteliale materno, elementi cardine, alla base di ipercoagulabilità, vasocostrizione, reazione infiammatoria e in ultima istanza dell'insorgenza dei sintomi e segni classici della preeclampsia. Tale teoria è stata in parte superata anche sulla base del fatto che un insufficiente rimodellamento delle arterie spirali è anche associato con ritardo di crescita fetale anche in assenza di ipertensione/proteinuria (55-56).

Inoltre biomarkers sierici di preeclampsia si riscontrano nel siero materno già nelle prime fasi di gravidanza (7° settimana) (50)

Le precoci alterazioni nelle concentrazioni dei marcatori sierici supportano la teoria che pone lo sviluppo della preeclampsia in una fase molto precoce della gravidanza, corrispondente all'inizio della placentazione, durante il periodo dell'impianto e probabilmente anche prima (9), conducendo alla formazione di una nuova ipotesi dell'origine placentare della preeclampsia. Secondo tale ipotesi durante i primi stadi dello sviluppo umano si verificherebbero molteplici differenziazioni cellulari e qualsiasi insulto presente in questa fase sembrerebbe provocare un danno a livello del trofoblasto con conseguente evoluzione verso preeclampsia, la restrizione di crescita intrauterina (FGR) o l'aborto.

In particolare il verificarsi di un insulto durante la prima differenziazione del trofoblasto nel passaggio da morula a blastocisti, o nel successivo differenziamento in citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto, sarebbe responsabile di un danno relativo a tutta la linea cellulare trofoblastica con possibile sviluppo di preeclampsia associata

ad FGR, oppure esito in aborto spontaneo. Nelle fasi successive si verifica la differenziazione del trofoblasto in villosa ed extravillosa. L'azione della noxa patogena in questo stadio, perciò, potrebbe determinare il coinvolgimento del trofoblasto extravillosa con alterazione nel processo di invasione delle arterie spirali e conseguente sviluppo di FGR; oppure il danno potrebbe interessare il trofoblasto villosa con eccessivo rilascio di STBM responsabili di una risposta infiammatoria materna esagerata con conseguente esordio della preeclampsia. L'analisi di quattro possibili scenari (gravidanza fisiologica; preeclampsia indotta da fattori placentari intrinseci, quella indotta da fattori estrinseci e quella da fattori materni) spiega la nuova ipotesi dell'origine placentare della preeclampsia: tale patologia sembrerebbe infatti derivare, in ultima analisi, da un fallimento della differenziazione del trofoblasto villosa con successivo rilascio esagerato di materiale trofoblastico all'interno della circolazione materna. Durante la gravidanza fisiologica i nuclei apoptotici più vecchi del sinciziotrofoblasto sono racchiusi in protrusioni apicali del tessuto chiamate "syncytial knots" (57). Queste strutture corpuscolari vengono rilasciate nella circolazione materna e, attraverso il sistema venoso, raggiungono i polmoni dove subiscono il processo di fagocitosi da parte dei macrofagi in modo tale da non essere più presenti nella circolazione periferica materna (58). Recentemente è stato inoltre dimostrato come tale processo risulti associato ad un diminuito rilascio di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi (59-60). Nella patologia preeclamptica il rilascio del materiale proveniente dal sinciziotrofoblasto non segue le normali regole, infatti, a causa di un'alterazione precoce nel processo di differenziazione del trofoblasto villosa, il rilascio dei "syncytial knots" non rappresenta più il principale meccanismo di eliminazione a disposizione, ma predominano altri processi come la necrosi e l'aponecrosi (57). L'aumento dei frammenti necrotici del trofoblasto si riscontra esclusivamente nella preeclampsia, mentre nelle gravidanze complicate da FGR i

livelli sono normali (58). I frammenti trofoblastici necrotici rilasciati, chiamati STBM, hanno dimensioni tali (200-600 nm) (60) da poter oltrepassare il filtro polmonare indenni, in modo tale da persistere nel sangue periferico materno, determinando alterazioni sistemiche a carico dell'endotelio materno e del processo infiammatorio. L'origine della preeclampsia può non essere solamente riferita ad alterazioni intrinseche del trofoblasto villosa ma anche a fattori estrinseci, responsabili di un aumento della massa o superficie placentare, e a fattori materni, come l'inadeguata risposta materna ai frammenti trofoblastici rilasciati nel circolo sanguigno (9,50). Specifiche condizioni responsabili dell'aumento della massa placentare (come il diabete e la gravidanza multipla) e/o della superficie placentare legata a condizioni ipossiche (come anemia materna, altitudine) sono associate ad un aumento del rilascio dei "syncytial knots". Se l'aumento dei frammenti trofoblastici apoptotici non è compensato da una maggior capacità del sistema materno di eliminazione, si può arrivare all'attivazione di un processo secondario di necrosi con conseguente sviluppo della preeclampsia.

Lo stesso esito sembra verificarsi nel caso di una reattività inappropriata del sistema infiammatorio materno nei confronti dei "syncytial knots" responsabile di un'attivazione sistemica con danno endoteliale e conseguente sviluppo della patologia preeclamptica. Questa recente ipotesi dell'origine placentare della preeclampsia associa tale patologia ad un'alterata differenziazione del trofoblasto villosa. Questa alterazione è responsabile dell'indebolimento della barriera placentare con conseguente rilascio di frammenti trofoblastici necrotici e conseguente una risposta infiammatoria materna. Inoltre, la teoria più recente sembra correlare il fallimento dell'invasione del trofoblasto extravilloso alla fisiopatologia del FGR, piuttosto che allo sviluppo della patologia preeclamptica (9).

D'altro canto Knofler in una sua recente dissertazione riguardo la regolazione

molecolare dell'invasione trofoblastica (50) , sottolinea come poco ancora si conosca circa il complesso network di fattori paracrini e autocrini, fattori trascrizionali , signaling pathways che controlla la differenziazione trofoblastica e la profondità ed il timing della sua invasione.

Marcatori sierici del difetto di placentazione e coinvolte esse stesse in tal processo, sono emerse dagli studi degli ultimi 5-10 anni alcune proteine placentari

Le evidenze più forti riguardano la Proteina Placentare 13, proteina dimerica contenuta negli endosomi di trofoblasto e rilasciata con un meccanismo calcio-dipendente , che sembra poter svolgere un ruolo nella migrazione del trofoblasto, nel rimodellamento e nell'impianto (61-63). È stato identificato un polimorfismo nel gene LGALS13 che codifica per la proteina (delezione frame shift nell'esone 3) nelle pazienti pre-eclamptiche. La mutazione sembrerebbe codificare per una variante più corta della wild type tale da non essere identificata dalle comuni metodiche ELISA PP13. Questo potrebbe spiegare il riscontro di valori significativamente ridotti già a 6-8 settimane di gravidanza. (61, 63)

PAPP-A (Pregnancy Associated Proteina A) e ADAM 12 (A Disintegna e Metalloproteasi) sono 2 proteasi placentari con azione su IGFBP-4 E 5. Bassi livelli di tali proteine riducono la disponibilità di IGF, rilevante nella regolazione dell'invasione deciduale, oltre che mitogeno e antiapoptotico. Questo spiegherebbe come topi Knock out per PAPP-A hanno un peso alla nascita ridotto del 60%(64-65).

DISFUNZIONE ENDOTELIALE

La disfunzione dell'endotelio vascolare viene considerato il primum movens di tutta una serie di eventi che si susseguono progressivamente e sembra spiegare la eterogenea espressività clinica di tale disordine (66). È stato ipotizzato, valutando il profilo di espressione genica a livello placentare, come uno squilibrio tra fattori

vasocostrittori e vasodilatatori possa essere una possibile causa dell'ipertensione che accompagna la preeclampsia (67).

Tali fattori identificati sono VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), PLGF (fattore di crescita placentare), sFlt-1 (fattore solubile 1 del recettore del VEGF), endogлина (Eng) (corecettore di membrana endoteliale per il TGF β -1 e β -3). Il VEGF e il PLGF sono entrambi secreti dalla placenta e circolano in elevate concentrazioni durante la gravidanza fisiologica. Si ritiene che entrambi questi fattori contribuiscano alla normale proliferazione trofoblastica e al fisiologico impianto placentare. L'sFlt-1 si lega al recettore neutralizzando l'azione angiogenica del VEGF e del PLGF (68) e si ritiene che sia uno dei peptidi coinvolti nella patogenesi della preeclampsia: numerosi sono gli studi che evidenziano come in pazienti affette da preeclampsia si riscontrino ridotti livelli circolanti di PLGF e VEGF ed elevate concentrazioni del fattore solubile Flt-1 (68) nelle prime settimane di gravidanza.

L'overespressione adenovirale di sFlt-1 in ratte gravide mimava le manifestazioni della malattia così come la terapia anti-VEGF in pazienti oncologici (69-70). Inoltre un elegante studio di Thadhani (71) mostra come l'estrazione mediante aferesi di sFlt-1 dal siero di pazienti preclamptiche portava alla riduzione di valori pressori delle stesse in 16 giorni.

Un altro peptide che sembra implicato nella patogenesi della preeclampsia è l'endogлина solubile (sEngl). Tale peptide è un corecettore per i fattori di crescita di trasformazione β 1 e β 3 ed è altamente espresso nelle membrane delle cellule endoteliali e del sinciziotrofoblasto.

Nel 2006 Venkatesha e coll (72) evidenziarono un aumento dell'endogлина solubile (s-Engl) nelle pazienti preclamptiche e riscontrarono un effetto sinergico nella combinazione tra s-Engl e Flt-1 nel favorire la comparsa delle forme più severe di preeclampsia inclusa la sindrome HELLP.

Nella sua review del 2011, Ramma (55) definitivamente ritiene che i dati presenti in letteratura soddisfino i criteri di numerosità , consistenza di associazione, di temporalità , sperimentazione , tali per cui lo squilibrio angiogenico e la disfunzione endoteliale possano essere considerati come fattori eziopatogenetici della preeclampsia. Al contrario conclude che sulla base delle evidenze l'infiammazione possa essere considerata una conseguenza piuttosto che una causa di preeclampsia.

STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo rappresenta uno stato patologico in cui predominano agenti pro-ossidanti rispetto quelli antiossidanti. Si ipotizza come lo stress ossidativo non si associ semplicemente alla patologia preeclamptica ma contribuisca anche direttamente all'eziologia della stessa (73). Il conseguente aumento della formazione di radicali liberi è responsabile di danni alle membrane cellulari, alle proteine e al DNA. Durante la gravidanza fisiologica è presente un lieve stato di stress ossidativo con un transitorio aumento della produzione di radicali liberi (ROS), i quali sono parzialmente neutralizzati da meccanismi di difesa antiossidanti . Jauniaux e coll (74) valutarono un aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti nel tessuto placentare in parallelo ad un aumento della tensione di ossigeno alla 10^a-12^a settimana di gestazione. Questi ipotizzarono come una diminuzione dei sistemi antiossidanti, in risposta allo stimolo ossigenativo, possa essere responsabile dello stress ossidativo, il quale condurrebbe ad una degenerazione del trofoblasto con possibile difficoltà nel processo di invasione dello stesso. È stato ipotizzato, inoltre, come la persistenza della tonaca muscolare nelle arterie spirali, secondaria ad un'alterata invasione trofoblastica, possa condurre ad un'intermittente perfusione placentare con un'alternanza di insulti ipossici e di riossigenazione responsabile di un conseguente

sviluppo dello stress ossidativo a livello placentare (75-76). Diversi studi hanno dimostrato come nelle pazienti affette da preeclampsia sia presente a livello placentare un aumento delle capacità nella formazione di radicali liberi e ione superossido conseguente ad una maggior espressione di sostanze pro-ossidanti (xantina ossidasi, NAD(P)H ossidasi) (77) spesso associata ad una diminuzione delle capacità antiossidanti. Il conseguente stress ossidativo sembra svolgere un ruolo chiave nello sviluppo dell'esagerata risposta infiammatoria materna che caratterizza la patologia preeclamptica (73). Inoltre nella suddetta patologia, lo stress ossidativo sembra essere associato ad una esagerata apoptosi trofoblastica e dei microvilli (78) con conseguente rilascio nel circolo materno di microparticelle placentari che sembrano contribuire all'eccessiva risposta infiammatoria materna (79-81).

Altri effetti sembrano essere la diminuzione dell'azione vasodilatante dell'ossido nitrico (NO) in seguito alla reazione con ione superossido con conseguente formazione del perossido nitrico coinvolto nel processo di necrosi ed apoptosi con successivo danno alle cellule endoteliali. Inoltre elevati livelli di lipidi perossidati inibiscono la prostaglandina H sintetasi determinando una riduzione nella concentrazione della prostaciclina (vasodilatante). Sia il danno cellulare che i radicali liberi di ossigeno stimolano il rilascio di endotelina (un potente vasocostrittore) il quale risulta essere aumentato nelle pazienti preeclamptiche (82). Lo stress ossidativo sembra infine alterare l'espressione genica, in particolare elevati livelli di ione superossido attiverrebbero alcuni fattori di trascrizione, coinvolti nella risposta infiammatoria materna e nel processo di ipertrofia tissutale (73).

FATTORI GENETICI

La preeclampsia è un disordine familiare complesso che coinvolge probabilmente più

geni in diverse vie di segnalazione biologica. La letteratura cita casi clinici, studi su gemelli, analisi mediante segregazione, analisi mediante linkage e studi di associazione, ma fino ad ora la ricerca non ha portato ad eclatanti progressi (83). La maggior parte degli studi genetici si è focalizzata su un numero esiguo di geni, che sfortunatamente non si sono rivelati utili per la comprensione della patologia. I fattori genetici coinvolti nella genesi della preeclampsia possono riguardare il versante materno, fetale e/o paterno (84).

Sebbene le cause ultime della preeclampsia rimangano sconosciute è forse ovvio che i geni debbano giocare un ruolo. Un numero imprecisato di disordini indotti geneticamente possono interferire con le risposte vascolari materne, influenzare la funzione trofoblastica o aumentare la massa placentare generando un aumento delle richieste fetali rispetto a quanto offerto. È noto come la preeclampsia sia presente in alcuni gruppi familiari. Il contributo genetico alla preeclampsia è verosimilmente complesso in quanto non segue una trasmissione mendeliana e coinvolge numerosi varianti e interazioni gene-gene. I geni coinvolti non causerebbero direttamente la preeclampsia ma piuttosto ridurrebbero la soglia biologica femminile alla quale la donna svilupperebbe tale condizione. Negli ultimi anni un numero di polimorfismi genici è stato associato al rischio di sviluppo di preeclampsia. Un recente studio, tuttavia, ha dimostrato come non sia possibile attribuire a singoli polimorfismi genici una associazione con lo sviluppo di preeclampsia (85)

Negli ultimi anni, alcuni studi, hanno mostrato come una serie di vie coinvolte nella crescita cellulare, nella tolleranza immunitaria ed in altre funzioni metaboliche sembrano avere un ruolo nella patogenesi della preeclampsia. Sebbene numerosi progressi siano stati compiuti per identificare i geni coinvolti in queste funzioni cellulari, non sono ancora stati descritti esaustivamente i fattori genetici associati ad un rischio maggiore di sviluppare la patologia preeclampica (86)

Studi di microarray placentare, nelle pazienti affette da preeclampsia, offrono una valida opportunità per confermare o smentire il coinvolgimento dei geni precedentemente descritti come possibili candidati a svolgere un ruolo nella patogenesi della preeclampsia ed eventualmente ad identificarne di nuovi. Diversi studi di microarray hanno analizzato l'espressione genetica placentare nella preeclampsia riportando, però, risultati poco soddisfacenti: si è riscontrata, infatti, solo una forte associazione dei geni della leptina e della tirosin chinasi 1 Fms-correlata con la patologia (87-90).

Enquobaharie e coll. hanno effettuato uno studio di microarray analizzando più di 15000 geni espressi a livello placentare, 58 dei quali (56 sovraregolati e 2 sottoregolati) risultano espressi diversamente nelle pazienti preeclamptiche rispetto ai controlli (Daniel 2008). Nell'ambito dei geni analizzati alcuni (LEP; FLT1; INHA; F2R) mostrano un significativo interesse a priori per il coinvolgimento nella patogenesi preeclamptica; altri (CYP11A; FCGR2B; HMOX1; PSG6; CDKN1C; TPBG) hanno una previsione limitata di associazione con la patologia, pur regolando funzioni cellulari potenzialmente importanti per la patogenesi della stessa. Tali geni sono coinvolti in molteplici processi e funzioni cellulari (infiammazione, sistema immunitario, stress ossidativo, crescita e differenziazione cellulare) dimostrando un possibile coinvolgimento genetico in diversi aspetti della patogenesi preeclamptica, e riflettendo, perciò, l'ampia complessità della patologia stessa (91).

Mutazioni nel gene della transtiretina(TTR) sono note per essere causa di anomalie strutturali ed instabilità della proteina che può precipitare ed aggregarsi determinando patologie da deposito tessutale chiamate amiloidosi. Recentemente è stato però anche rilevata l'importanza di altre condizioni non genetiche, come la presenza di stress ossidativo, responsabili dell'instabilità del tetramero e della sua dissociazione nei suoi componenti monomerici nella patogenesi di una patologia

amiloide acquisita, l'amiloidosi sistemica senile (SSA). Si sa inoltre che i ligandi naturali di TTR (RBP-retinolo e tiroxina) giocano un ruolo fondamentale nella stabilità della molecola di TTR e che, viceversa, la presenza della fisiologica struttura quaternaria di TTR (tetrameric) è necessaria al legame e trasporto della tiroxina e del retinolo (92)

Il possibile ruolo della transtiretina nella patogenesi della pre-eclampsia ed il suo possibile utilizzo come marker preclinico di patologia è stato evidenziato da un recente studio pilota condotto dalla nostra Clinica Ostetrico-Ginecologica in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Udine (93-94). In questo studio è stata comparata la composizione proteica dei liquidi amniotici del secondo trimestre di 5 gravidanze normodecorse con 5 gravidanze in seguito complicate da pre-eclampsia utilizzando nuove tecniche di analisi proteomica. Nei campioni di donne che in seguito hanno sviluppato pre-eclampsia è stata evidenziata una marcata preponderanza della forma dissociata della molecola (monomeric) rispetto alla sua forma integra

I risultati del nostro studio suggeriscono quindi la presenza di effetti correlati allo stress ossidativo (ossidazione e rottura della molecola di TTR) già a 16 settimane gestazionale circa, vale a dire in una fase preclinica della preeclampsia, e suggeriscono il possibile ruolo della transtiretina nella patogenesi della preeclampsia attraverso un'alterata funzione di trasporto dei suoi ligandi, tiroxina e retinolo.

Recentemente è stato evidenziato il ruolo della Retinol Binding Protein 4 (RBP4) nella patogenesi della preeclampsia. RBP4 è una proteina plasmatica, classificata come nuova adipokina, prodotta dal fegato e dagli adipociti, il cui ruolo è già stato evidenziato nell'insulinoresistenza e nell'infiammazione. In letteratura sono presenti pochi dati circa RBP4 nelle pazienti preeclamptiche ed i risultati presenti sono discordanti. In tutti i lavori i dosaggi venivano comunque eseguiti in fase conclamata di

malattia. Resta da valutarne quindi il ruolo in fase precoce (95-98)

SCREENING DELLA PREECLAMPSIA

Attuare una prevenzione nei confronti della preeclampsia significa innanzitutto

identificare le donne a rischio; in presenza di possibili fattori di rischio, infatti, le donne possono essere destinate a una sorveglianza prenatale intensiva e ad interventi di tipo profilattico (prevenzione secondaria).

Come è stato descritto nelle precedenti sezioni dedicate, esistono fattori di rischio anamnestico ben definiti, per alcuni dei quali è stata dimostrata un'associazione significativa con lo sviluppo di preeclampsia ($RR > 2$) (tabella I).

Tuttavia allo stato attuale la patologia viene riscontrata in fase conclamata e non esistono delle metodiche validate per identificare delle pazienti a rischio da sottoporre a sorveglianza intensiva e profilassi farmacologica. Per tal motivo i diversi trial realizzati sull'utilizzo di varie sostanze profilattiche (aspirina, eparina a basso peso molecolare, sostanza antiossidanti) spesso hanno fallito il loro obiettivo .

Tabella I. Principali fattori di rischio per preeclampsia

Pregressa preeclampsia
Iperensione arteriosa pregravidica
Patologia renale pregravidica
Gravidanza plurima
Sd da anticorpi antifosfolipidi
Diabete pregravidico

Negli ultimi anni sono state impiegate molte risorse al fine di identificare test di screening di tipo fisiologico e biochimico per identificare le donne a maggior rischio di preeclampsia, ma nessuno di questi ha dimostrato un valore predittivo significativo e pochi sono usati nella pratica clinica; questo dipende soprattutto dal fatto che le cause di preeclampsia non sono a tutt'oggi ancora note.

Poichè il fattore cardine classicamente è rappresentato dall'insufficienza della circolazione utero-placentare dovuta al fallimento dell'invasione trofoblastica e all'insufficiente trasformazione del circolo utero-placentare in un circolo a basse resistenze, l'utilizzo della flussimetria doppler del distretto vascolare materno-uterino è diventata pratica di routine per svelare un aumento delle resistenze al flusso nel II trimestre (intorno alla 20° settimana, ma con maggiore predittività intorno alla 24° settimana, una volta concluso il difetto di placentazione). Numerosa è la letteratura a riguardo: vi è un rischio aumentato di circa 6 volte di sviluppo di preeclampsia per test positivo (99). Questo certo può comportare una maggiore sorveglianza materno-fetale, ma fallisce il concetto di screening che per definizione deve corrispondere a una diagnosi precoce tale da comportare misure di prevenzione prim.

Poichè la causa della preeclampsia non è a tutt'oggi nota e i test di screening rimangono comunque non del tutto validati, risulta difficile proporre strategie razionali per la sua prevenzione. Arrivare ad ottenere una prevenzione primaria della preeclampsia, ovvero prevenirne l'insorgenza, è il tentativo che i numerosi trials condotti hanno portato avanti in questi anni.

Le strategie che si tenta di mettere in atto per prevenire l'insorgenza della preeclampsia sono basate sulla sorveglianza prenatale, sulle modificazioni dello stile di vita, su supplementazioni dietetiche e sulla terapia farmacologica.

La sorveglianza prenatale nelle donne a rischio di preeclampsia comprende una valutazione seriata della pressione arteriosa e della proteinuria e degli esami ematochimici indicativi di preeclampsia. Diverse ipotesi hanno collegato deficit nutrizionali e maggior rischio di preeclampsia: supplementazioni dietetiche di calcio, acidi grassi polinsaturi, zinco, magnesio e vitamine, come la C e la E, sono state

proposte nel tentativo di contrastare l'insorgenza della preeclampsia, anche se senza evidenze di una dimostrata loro efficacia. Non sembra invece in alcun modo dimostrata l'efficacia di una dieta iposodica nella prevenzione della preeclampsia.

Per quanto riguarda la profilassi farmacologica, i dati non hanno evidenziato vantaggio dall'utilizzo di calcio, acidi grassi polinsaturi, antiossidanti. Riveste un ruolo significativo, invece, la somministrazione di aspirina a basse dosi (< 100 mg) in epoca precoce (< 20 settimane) in donne con anamnesi positiva per pregressa preeclampsia e ritardo di crescita fetale (100). Non conclusivi i dati circa l'utilizzo di eparina a basse dosi molecolari, eccezion fatta per le pazienti trombofiliche, riguardo la prevenzione in pazienti ad alto rischio.

Fatta tale premessa sicuramente negli ultimi anni notevoli sono stati gli sforzi per l'individuazione di marcatori precoci di patologia. Le evidenze che numerosi biomarkers quali proteine placentari, fattori vasoattivi, fattori angiogenici/antiangiogenici sono riscontrabili nel siero di donne che diventeranno preeclamptiche, già durante le prime settimane di gravidanza, ha spinto i ricercatori a valutarne la reale associazione ed eventuale predittività.

PP13

Sono già state descritte precedentemente le caratteristiche e verosimili funzioni di tale proteina placentare, prodotta in elevate concentrazione durante le prime settimane di gravidanza e coinvolta nel processo di placentazione

Diversi studi, capostipite il gruppo del professor Nicolaides, hanno riscontrato valori di pp13 significativamente ridotti già a 6-8 settimane di gestazione in pazienti che svilupperanno preeclampsia con una detection rate intorno all'80% soprattutto per le forme early onset (101-106). La determinazione nel II trimestre non sembra

statisticamente significativa nemmeno in associazione con il doppler delle arterie uterine

Diversi studi più recenti (107-108) hanno confermato i medesimi risultati (tabella II)

È stata studiata (109) l'espressione di mRNA di pp13 a livello di sinciziotrofoblasto , riscontrandone valori significativamente più bassi nella pazienti preeclampriche durante il III trimestre di gravidanza ed anche a 11 settimane in campioni ottenuti dal prelievo dei villi coriali

Tabella II. Significatività di PP13 nella predizione del rischio di PE

Autore	PE N	PE MoM	Controlli N	Controlli Mom	P	DR% (CI)
Nicolaides(101)	10	0.07	423	1.00	<0.001	80 (44-98)
Chafetz (102)	47	0.2	290	1.0	<0.001	79 (64-89)
Spencer (103)	44	0.63	446	1.0	<0.001	90(84-96)
Gonen (104)	40	0.28	1178	1.0	<0.004	80 (58-90)
Romero (105)	6	0.26	250	1.00	0.002	100

Khalil (106)	42	0.4	210	1.00	<0.001	71 (55-92)
Odibo (107)	42	0.68	410	1.00	<0.001	79(60-98)
Wortelboer(108)	88	0.68	478	0.99	<0.001	36 (27-47)

PAPP-A

Utilizzata di routine nello studio delle aneuploidie fetali a 11-14 settimane, è stata associata a diversi outcome ostetrici. Bassi valori di PAPP-A sono significativamente associati con preeclampsia early onset, ma con significatività basse. Inoltre l'associazione di PAPP-A non sembra migliorare la detection rate di doppler arterie uterine e storia familiare. (102, 108, 110-115). Uno studio retrospettivo di recente condotto nella nostra clinica (presentato in Germania e i cui dati sono in press) , condotto su 1119 donne , ha dimostrato che valori di PAPP-A inferiori al cut-off durante il I trimestre di gravidanza individuato aumentavano il rischio di 3 volte di sviluppo di preeclampsia, con valori di detection rate simili a quelli anamnestici (116)

FATTORI ANGIOGENETICI/ANTIANGIOGENETICI

Elemento cardine alla base delle manifestazioni cliniche si è detto essere la disfunzione endoteliale.

Si è anche definito precedentemente il ruolo dei fattori angiogenici e la loro modificazione nelle gravidanze fisiologiche e in quelle affette da disordine ipertensivo.

Gli studi principali si sono concentrati principalmente durante la seconda metà della gravidanza o in fase conclamata di malattia, quando è evidente un incremento di fattori antiangiogenetici (sFlt-1, s-Eng) e una riduzione di quelli proangiogenecici (VEGF, PlGF) nei casi rispetto ai controlli.(117-119,48).

Comunque studi rappresentativi hanno dimostrato che sFlt-1 e s-Eng venivano espressi in maniera costante nel I trimestre e che la loro concentrazione sierica poteva risultare più bassa nei controlli rispetto a quelle nelle pazienti destinate a sviluppare preeclampsia (120-123). Tuttavia sono scarsi e non concludenti gli studi che testano tali fattori come biomarkers di screening nel primo trimestre.

Maggiori sono i dati su PIGF che può essere dosato già a 9 settimane, al contrario di VEGF. La concentrazione di PIGF incrementano nell'arco della gravidanza in condizioni fisiologiche, mentre nelle gravidanze destinate a sviluppare preeclampsia PIGF incrementava meno o rimaneva basso durante la gravidanza .

La DR per PIGF nel I trimestre per la predizione di preeclampsia early onset varia negli studi dal 40 al 60%., mentre risulta del 30% per preeclampsia late onset.(48, 108-110, 120-122,124-126)

SCOPO DELLO STUDIO

La preeclampsia è una seria complicanza ostetrica che si riscontra nel 5-8% delle gravidanze, gravata da importante morbilità e mortalità materna e perinatale, soprattutto nelle forme ad esordio precoce.

Si verifica principalmente in donne nullipare che sono *a priori* a basso rischio , senza una storia ostetrica e si diagnostica in fase conclamata.

Inoltre la patogenesi della malattia risulta a tutt'oggi poco definita.

Questi sono i motivi per i quali allo stato attuale non esiste una popolazione a rischio da sottoporre a sorveglianza intensiva e, a livello sperimentale , a misure di profilassi farmacologica.

Negli ultimi 5 anni gli studi si sono concentrati sulla ricerca di marcatori sierici precoci

di preeclampsia sulla base delle moderne ipotesi patogenetiche: proteine placentari, markers di difetto di placentazione, fattori angiogenici-antiangiogenici, fattori vasoattivi, fattori coinvolti nello stress ossidativo

Scopo dello studio è quello di identificare una popolazione a rischio di preeclampsia sulla base delle ipotesi patogenetiche correnti, attraverso il dosaggio di un pool di marcatori sierici durante il I trimestre di gravidanza in occasione dell'ultrascreen per lo screening delle aneuploidie fetali

MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto uno studio prospettico caso-controllo tra il 2005 e il 2011 presso la Clinica di Ostetricia e Ginecologia dell'azienda Ospedaliero-Universitaria S.Maria della misericordia di Udine in collaborazione con il Laboratorio analisi della stessa.

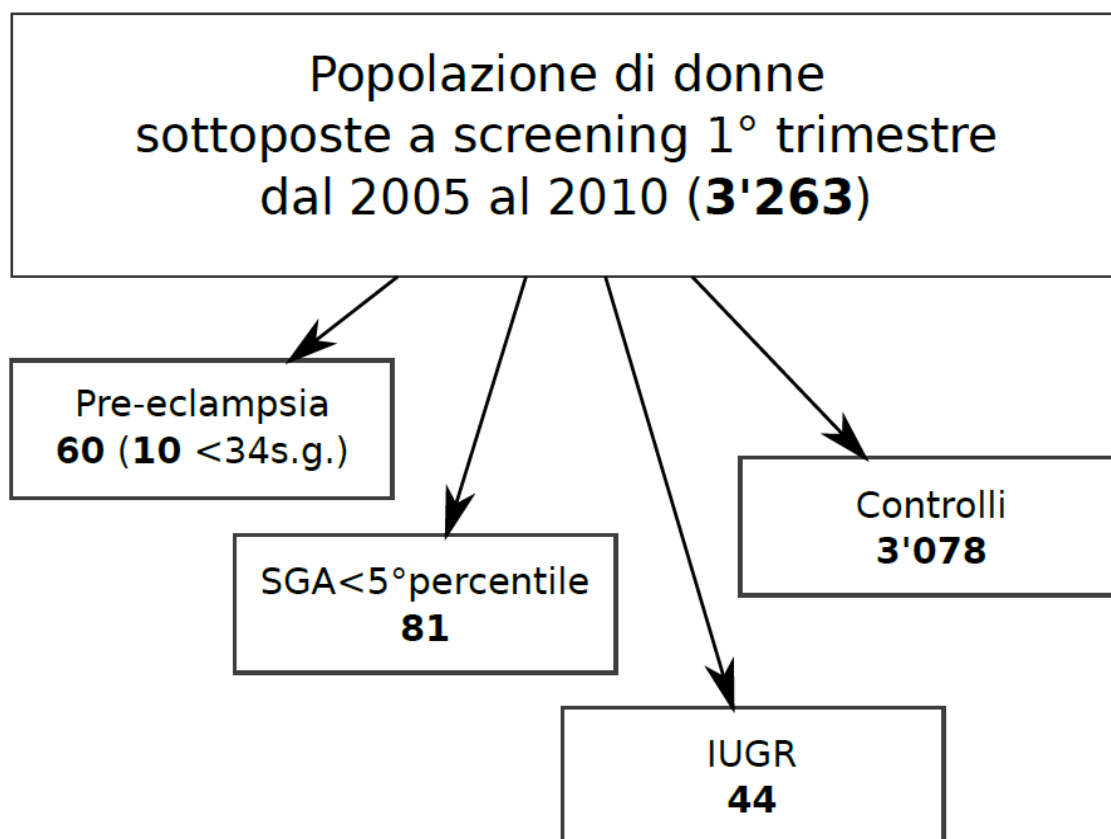
La popolazione oggetto del nostro studio è quella sottoposta a screening sierologico ed ecografico delle aneuploidie fetali durante il primo trimestre (11-13+6 sg) .

Per tutte le pazienti sono stati raccolti i seguenti dati: epoca dello screening, razza, età materna e paterna, peso, altezza, fumo, ipertensione preesistente alla gravidanza, familiarità, diabete pregravidico, outcome della gravidanza.

Immediatamente i campioni sono stati centrifugati ed aliquotati e sono stati dosati free-beta-HCG e PAPP-A, che sono i due marcatori attualmente in uso per lo screening delle tre più frequenti triploidie cromosomiche (13, 18 e 21). PAPP-A e

Free-beta-HCG sono stati dosati mediante Kryptor (Brahms GmbH) usando i reagenti per PAPP-A e Free-beta-HCG (Brahms, Kryptor).

Questa prima parte dello studio ha riguardato 3263 gravidanze singole sottoposte a screening del I trimestre e che avessero partorito presso la nostra clinica tra il 2005 e il 2010 (schema 1) ampliando uno studio già presentato di recente (116)



Schema 1

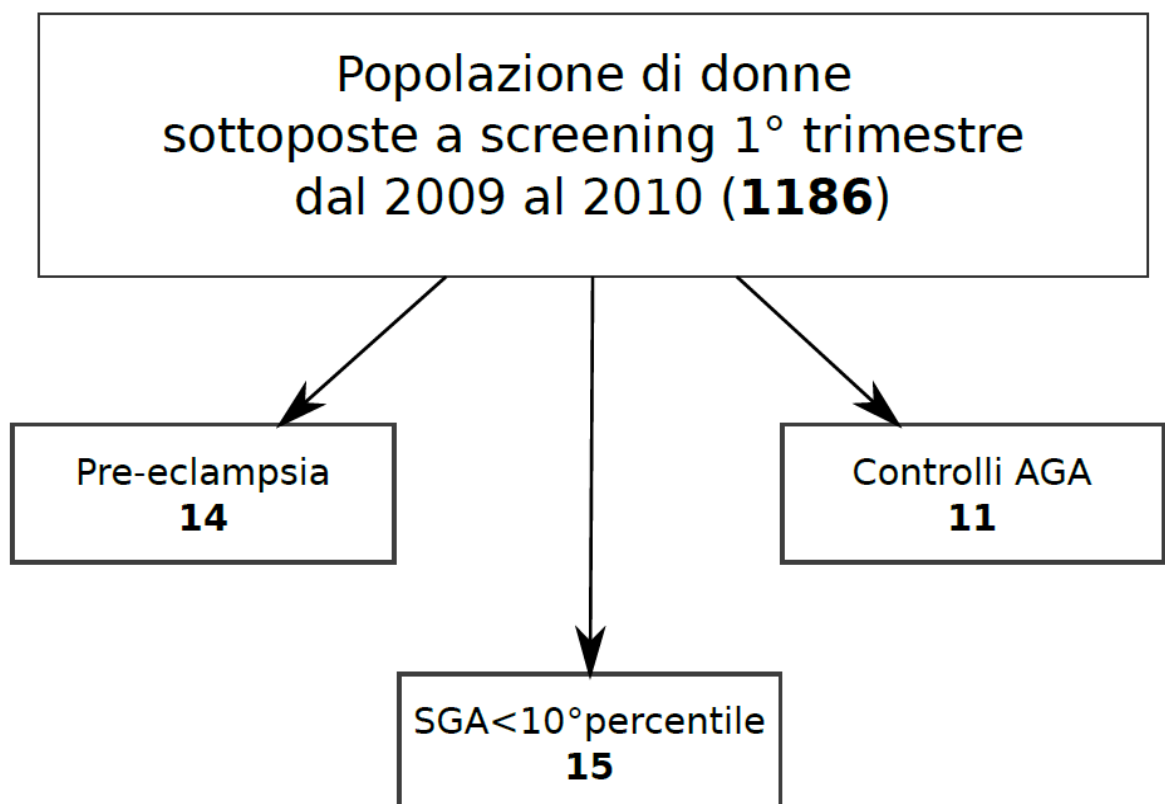
Dal 2008 i campioni sono stati quindi conservati a -80° per successivi approfondimenti per lo studio di un algoritmo predittivo nel primo trimestre per l'insorgenza di patologie ipertensive della gravidanza e ritardo di crescita intrauterino. La necessità di limitazione dei costi ha imposto la restrizione dei dosaggi a 40 pazienti (schema 2).

Il nostro campione è stato rappresentato perciò da 40 donne

Sono stati dosati i seguenti reagenti mediante tecnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): PIGF (EK0490), PP13 (CSB-E12733h, Cusabio), RBP4 (EK0831). Le misurazioni sono state compiute su siero conservato a -80°C dei campioni precedentemente raccolti. Ogni Kit ELISA conteneva piastre e reagenti per 96 dosaggi. Le procedure per i dosaggi sono state eseguite in accordo con le istruzioni provviste dal produttore. Tutti i dosaggi sono stati eseguiti due volte.

Sono stati inoltre dosati alfafetoproteina, albumina, colesterolo, HDL, LDL, trigliceridi, progesterone, 17-beta-estradiolo, apo A, apo B. Per tutti i campioni sono stati effettuati due dosaggi.

In corso su un maggior numero di campioni è il dosaggio di Transtiretina, TTR, TSH, il T3 ed il T4.



Schema 2

Definizioni

La diagnosi di preeclampsia è stata eseguita secondo i criteri dell'International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) (5), ovvero in presenza di valori pressori $> 140/90$ in almeno 2 occasioni a distanza di 4 ore dopo la 20^a settimana gestazionale in donne precedentemente normotese, e di proteinuria ($>$ di 300 mg/24 ore). Si è definita come preeclampsia precoce o tardiva rispettivamente la forma ad insorgenza precedente o successiva alle 34 settimane di gestazione.

I casi erano classificati secondo al centile di nascita usando la curva di crescita secondo Kloosterman e classificando come piccolo per età gestazionale (SGA) un peso $< 5^{\circ}$ o 10° percentile.

La diagnosi di ritardo di crescita fetale intrauterina (IUGR) è stata posta per feti con peso stimato o circonferenza addominale $<$ al 10° percentile con un indice di pulsatilità in arteria ombelicale > 2 deviazioni standard (127-128)

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante R (versione 2.14.0). È stata considerata significativa una $p < 0.05$. La normalità della distribuzione è stata accertata con test di Kolmogorov-Smirnoff. Inoltre sono stati usati i seguenti test statistici:

in caso di variabili continue t test, one way ANOVA o test di Kruskal-Wallis dove appropriato.

in caso di variabili categoriche chi-quadrato e test esatto di Fisher. Dove appropriato.

Inoltre è stata eseguita anche un'analisi multivariata mediante regressione logistica

RISULTATI

Parte I

Tra il 2005 e il 2010 sono state sottoposte a screening per le anomalie cromosomiche durante il primo trimestre 3263 donne e che hanno partorito successivamente nella Clinica Ostetrica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine.

Le caratteristiche delle pazienti sono riportate in Tabella 1 e Tabella 2

L'età media materna era 32.2 anni, nel 93% di razza caucasica, nullipare nel 51% dei casi. La percentuale di parti spontanei è stata del 61%.

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione di studio

Età materna (anni)	32.2 (\pm 4.6)
Età paterna (anni)	35.5 (\pm 6)
Differenza età genitori (anni)	4.4 (\pm 4.3)
Macro-area di provenienza	
Africa Sub-Sahariana	2.8% (91/3261)
Asia	0.9% (28/3261)
Est Europa	7.5% (243/3261)
Italia	86% (2806/3261)
Ovest Europa	0.5% (16/3261)
Paesi Arabi	1.8% (58/3261)
Sud America	0.6% (19/3261)
Grado di istruzione materna	
Laurea	33.1% (1079/3263)
Media sup	49.2% (1607/3263)
Media inf/elem/analf	17.7% (577/3263)
Grado di istruzione paterno	
Laurea	23.6% (764/3233)
Media sup	50.5% (1633/3233)
Media inf/elem/analf	25.9% (836/3233)
Stato sociale	
Non coniugata	7% (230/3263)
Coniugata/convivente	90.5% (2953/3263)
Separata/vedova/divorziata	2.5% (80/3263)
Pregressa storia ostetrica	
Nulliparità	51.2% (1671/3263)
Pregressi aborti	2.9% (93/3263)
Pregresse IVG	5.4% (175/3263)

Tabella 2. Caratteristiche ostetriche

Epoca gestazionale alla prima visita (settimane)	7.4 (\pm 2.2)
Numero di visite ostetriche	6.0 (\pm 2.7)
Numero di ecografie	6.6 (\pm 2.5)
Modalità del concepimento	
Spontanea	98.3% (3207/3263)
Induzione ovulazione/IUI	0.7% (24/3263)
FIVET/ICSI	1% (32/3263)
Modalità del travaglio	
Spontaneo	59.4% (1783/3000)
Indotto/Pilotato	23.3% (700/3000)
Senza travaglio	17.2% (517/3000)
Modo parto	
Parto spontaneo	61.6% (2010/3263)
Parto operativo	9.9% (323/3263)
Taglio cesareo	28.5% (930/3263)

Per quanto riguarda l'outcome della gravidanza la prevalenza di preclampsia è stata del 2% comprensivi dei casi precoci (< 34 sg) e tardivi (> 34sg), quella del ritardo di crescita intrauterino (IUGR) del 1.3% e quella dei feti piccoli per età gestazionale (SGA) <5° percentile del 3.8%. (Tabella 3)

Tabella 3. Outcome della gravidanza

Genere neonato	
Femminile	50% (1631/3263)
Maschile	50% (1632/3263)
Epoca gestazionale al parto (settimane)	38.9 (±1.9)
Peso placentare (grammi)	588.6 (±119.5)
Placental index	0.2 (±0)
Lunghezza neonato (cm)	49.9 (±2.7)
Circonferenza cranica neonato (mm)	343.2 (±17.7)
Peso neonato (grammi)	3318.3 (±514.1)
MoM peso neonato	1 (±0.1)
SGA sotto 5° perc	3.8% (124/3263)
SGA sotto 10° perc	8.6% (281/3263)
LGA sopra 90° perc	9.5% (311/3263)
LGA sopra 95° perc	5% (162/3263)
Apgar 1° minuto	8.2 (±1.3)
Apgar 5° minuto	8.9 (±0.8)
Pre-eclampsia	2% (65/3263)
IUGR	1.3% (44/3263)
Anomalie metabolismo glucidico gestazionali	
GDM (diabete gestazionale)	3.7% (109/2967)
IGT (intolleranza glucidica)	2.0% (60/2967)

Rianimazione del neonato	1.7% (56/3263)
Ricovero in NICU	3.4% (110/3263)

Le pazienti affette da preeclampsia (Tabella 4) risultavano significativamente con BMI gravidico più elevato, di condizioni socio-economiche più scadenti con maggiore incidenza di razza africana.

In queste pazienti la PAPP-A MoM è risultata significativamente ($p < 0.05$) inferiore con un valore di 0.9 rispetto ai controlli a differenza del free beta HCG

Anche la presenza di alterazioni flussimetriche (notch bilaterale) nelle arterie uterine a 20 sg in queste pazienti si è dimostrato fattore di rischio (9.2%vs2.2%).

Nel considerare, invece, solo le pazienti affetti da preeclampsia early onset (Tabella 5), scomparivano le differenze in termini di BMI pregravidico e di condizioni sociali, mentre tra i fattori anamnestici rimaneva significativa ($P < 0.05$) la differenza di razza e l'incidenza di Diabete pre-gravidico. Per quanto riguarda i parametri predittivi oggetto di studio, il valore di PAPP-A era significativamente inferiore nei casi con una MoM di 0.6 rispetto ad una MoM di uno nei controlli (vs 1) ed anche di free Beta HCG era significativamente inferiore nei casi (MoM 0.8 vs 1.29). Anche le alterazioni flussimetriche uterine si presentavano con maggior frequenza nei casi 30%vs 2.1%).

Tabella 4- Caratteristica delle pazienti con Preeclampsia

	Non affette	Affette da PE	p
Età materna	32.2 (± 4.7)	33 (± 4.7)	0.172
Differenza età genitori (anni)	4.4 (± 4.4)	3.7 (± 3.7)	0.153
BMI pregravidico (kg/m^2)	22.7 (± 3.9)	27.6 (± 6.4)	<0.05
PAPP-A MoM	1 (± 0.6)	0.9 (± 0.5)	<0.05
MoM peso neonato	1 (± 0.1)	1 (± 0.2)	0.705
Free β -HCG MoM	1.2 (± 0.9)	1.1 (± 1.2)	0.413
MoM NT	1 (± 0.2)	0.9 (± 0.1)	0.097
Nulliparità	55.7% (1634/2935)	56.9% (37/65)	0.841
Fumo	3.8% (111/2935)	6.2% (4/65)	0.325
FIVET/ICSI	1.1% (31/2935)	1.5% (1/65)	0.708
DM pregravidico	0.9% (25/2643)	3.3% (2/61)	0.070
GDM/IGT	6% (158/2643)	4.9% (3/61)	0.729
Notch bilaterale a 20 sg.	2.2% (66/2935)	9.2% (6/65)	<0.05

Genere neonato			
Femminile	49.5% (1453/2935)	46.2% (30/65)	0.593
Maschile	50.5% (1482/2935)	53.8% (35/65)	0.593
Area geografica			
Africa Sub-Sahariana	2.6% (75/2934)	16.9% (11/65)	<0.05
Asia	0.9% (26/2934)	3.1% (2/65)	0.069
Est Europa	8% (236/2934)	3.1% (2/65)	0.143
Italia	85.6% (2512/2934)	73.8% (48/65)	<0.05
Ovest Europa	0.5% (14/2934)	0% (0/65)	0.577
Paesi Arabi	1.9% (56/2934)	1.5% (1/65)	0.829
Sud America	0.5% (15/2934)	1.5% (1/65)	0.261
Istruzione materna			
Laurea	27.7% (813/2935)	13.8% (9/65)	<0.05
Altro titolo Universitario	6% (176/2935)	6.2% (4/65)	0.958
Scuola media superiore	48.9% (1434/2935)	55.4% (36/65)	0.298
Scuola media inferiore	16.6% (486/2935)	21.5% (14/65)	0.287
Elementare/nessun titolo	0.9% (26/2935)	3.1% (2/65)	0.069

Tabella 5- Caratteristica delle pazienti con Preeclampsia precoce <34 sg.

	Non affette	Affette da PE <34sg	p
Età materna	32.2 (±4.6)	34.6 (±5.3)	0.185
Differenza età genitori (anni)	4.4 (±4.3)	3.6 (±3)	0.437
BMI pregravidico (kg/m ²)	22.8 (±4)	24.5 (±4.7)	0.274
PAPP-A MoM	1 (±0.6)	0.6 (±0.2)	<0.05
MoM peso neonato	1 (±0.1)	0.9 (±0.2)	<0.05
Free β-HCG MoM	1.2 (±0.9)	0.8 (±0.4)	<0.05
MoM NT	1 (±0.2)	0.9 (±0.1)	<0.05
Nulliparità	55.7% (1665/2990)	60% (6/10)	0.784
Fumo	3.8% (124/3253)	10% (1/10)	0.309
FIVET/ICSI	1% (32/3253)	0% (0/10)	0.753
DM pregravidico	0.9% (26/2959)	12.5% (1/8)	<0.05
GDM/IGT	5.7% (169/2959)	0% (0/8)	0.486
Notch bilaterale a 20 sg.	2.1% (69/3253)	30% (3/10)	<0.05
Genere neonato			
Femminile	49.9% (1624/3253)	70% (7/10)	0.205
Maschile	50.1% (1629/3253)	30% (3/10)	0.205
Area geografica			
Africa Sub-Sahariana	2.7% (89/3251)	20% (2/10)	<0.05
Asia	0.9% (28/3251)	0% (0/10)	0.768
Est Europa	7.5% (243/3251)	0% (0/10)	0.369
Italia	86.1% (2798/3251)	80% (8/10)	0.580
Ovest Europa	0.5% (16/3251)	0% (0/10)	0.824
Paesi Arabi	1.8% (58/3251)	0% (0/10)	0.670
Sud America	0.6% (19/3251)	0% (0/10)	0.808
Istruzione materna			
Laurea	27.1% (881/3253)	20% (2/10)	0.615
Altro titolo Universitario	6% (196/3253)	0% (0/10)	0.423
Scuola media superiore	49.2% (1602/3253)	50% (5/10)	0.962
Scuola media inferiore	16.8% (545/3253)	30% (3/10)	0.263
Elementare/nessun titolo	0.9% (29/3253)	0% (0/10)	0.764

PAPP-A MoM e flussimetria materna a 20 sg sembrano predire, anche se con meno forza, feti piccoli per età gestazionale e IUGR (Tabella 6 e 7)

Tabella 6- Caratteristiche delle pazienti con Feti piccoli per epoca gestazionale (<5° percentile)

	Non affette	SGA<5p	p
Età materna	32.2 (±4.6)	33.2 (±4.8)	<0.05
Differenza età genitori	4.3 (±4.3)	4.7 (±4.4)	0.424
BMI pregravidico (kg/m ²)	22.8 (±4)	21.7 (±4.2)	<0.05
PAPP-A MoM	1 (±0.6)	0.8 (±0.5)	<0.05
MoM peso neonato	1 (±0.1)	0.8 (±0.1)	<0.05
Free β-HCG MoM	1.2 (±0.9)	1.1 (±0.9)	0.077
MoM NT	1 (±0.2)	1 (±0.2)	0.724
Nulliparità	55.3% (1595/2886)	66.7% (76/114)	<0.05
Fumo	3.7% (117/3139)	6.5% (8/124)	0.121
FIVET/ICSI	1% (30/3139)	1.6% (2/124)	0.466
DM pregravidico	0.9% (27/2857)	0% (0/110)	0.306
GDM/IGT	5.8% (165/2857)	3.6% (4/110)	0.342
Notch bilaterale a 20 sg.	2.1% (66/3139)	4.8% (6/124)	<0.05
Genere neonato			
Femminile	50% (1571/3139)	48.4% (60/124)	0.717
Maschile	50% (1568/3139)	51.6% (64/124)	0.717
Area geografica			
Africa Sub-Sahariana	2.8% (87/3137)	3.2% (4/124)	0.764
Asia	0.9% (28/3137)	0% (0/124)	0.291
Est Europa	7.6% (238/3137)	4% (5/124)	0.139
Italia	85.8% (2693/3137)	91.1% (113/124)	0.096
Ovest Europa	0.5% (16/3137)	0% (0/124)	0.425
Paesi Arabi	1.8% (57/3137)	0.8% (1/124)	0.404
Sud America	0.6% (18/3137)	0.8% (1/124)	0.738
Istruzione materna			
Laurea	27.1% (850/3139)	26.6% (33/124)	0.909
Altro titolo Universitario	6% (189/3139)	5.6% (7/124)	0.863
Scuola media superiore	49.1% (1541/3139)	53.2% (66/124)	0.366
Scuola media inferiore	16.9% (531/3139)	13.7% (17/124)	0.349
Elementare/nessun titolo	0.9% (28/3139)	0.8% (1/124)	0.921

Tabella 7- Caratteristiche delle pazienti con Feti IUGR.

	Non affetti	IUGR	p
Età materna	32.2 (±4.6)	32.4 (±5.5)	0.822
Differenza età genitori (anni)	4.4 (±4.3)	4.4 (±4.4)	0.914
BMI pregravidico (kg/m ²)	22.8 (±4)	21.4 (±3.6)	<0.05
PAPP-A MoM	1 (±0.6)	0.8 (±0.5)	<0.05
MoM peso neonato	1 (±0.1)	0.8 (±0.1)	<0.05
Free β-HCG MoM	1.2 (±0.9)	1.2 (±1)	0.659
MoM NT	1 (±0.2)	0.9 (±0.2)	<0.05
Nulliparità	55.5% (1640/2956)	70.5% (31/44)	<0.05
Fumo	3.8% (121/3191)	4.5% (2/44)	0.795
FIVET/ICSI	1% (31/3191)	2.3% (1/44)	0.386
DM pregravidico	0.9% (27/2900)	0% (0/39)	0.545
GDM/IGT	5.8% (169/2900)	0% (0/39)	0.120
Notch bilaterale a 20 sg.	2.2% (69/3191)	6.8% (3/44)	<0.05
Genere neonato			
Femminile	49.9% (1593/3191)	47.7% (21/44)	0.772
Maschile	50.1% (1598/3191)	52.3% (23/44)	0.772
Area geografica			
Africa Sub-Sahariana	2.7% (87/3189)	9.1% (4/44)	<0.05
Asia	0.9% (28/3189)	0% (0/44)	0.532
Est Europa	7.6% (243/3189)	0% (0/44)	0.057
Italia	85.9% (2740/3189)	88.6% (39/44)	0.607
Ovest Europa	0.5% (16/3189)	0% (0/44)	0.638
Paesi Arabi	1.8% (57/3189)	2.3% (1/44)	0.810
Sud America	0.6% (18/3189)	0% (0/44)	0.617
Istruzione materna			
Laurea	27% (861/3191)	34.1% (15/44)	0.292
Altro titolo Universitario	6.1% (195/3191)	2.3% (1/44)	0.289
Scuola media superiore	49.2% (1571/3191)	38.6% (17/44)	0.163
Scuola media inferiore	16.8% (535/3191)	25% (11/44)	0.148
Elementare/nessun titolo	0.9% (29/3191)	0% (0/44)	0.525

L'analisi multivariata (Tabella 8-9-10-11) ha confermato il ruolo dei fattori anamnestici noti (razza, BMI-pregravidico e diabete pre-gravidico) come predittori di preeclampsia late ed early con alcune differenze tra le due forme, a porre l'accento sulla verosimile diversa eziopatogenesi.

Il logaritmo base dieci di PAPP-A MoM si è dimostrato fattore predittivo di patologia ostetrica, soprattutto delle forme precoci di preeclampsia e di IUGR. Qui di seguito riportiamo gli Odds Ratio rispettivamente di preeclampsia, preeclampsia precoce

SGA, e IUGR: OR 0.62 (0.4 - 0.96), AUC 81% CI 74-87; OR 0.47 (0.16 - 1.35), AUC 89% CI 80-99%; OR 0.47 (0.31 - 0.7) AUC 68% CI 62-74%; OR 0.44 (0.26 - 0.76) AUC 75% CI 67-83%.

Tabella 8- Modello multivariato predittivo per preeclampsia

	OR (IC95%)	p
Africa Sub-sahariana	5.58 (2.67 - 11.67)	<0.05
Età materna	1.03 (0.97 - 1.08)	0.347
BMI pregestazionale	1.19 (1.14 - 1.24)	<0.05
DM pre-gestazionale	4.71 (1.34 - 16.62)	<0.05
Diploma universitario materno	0.61 (0.31 - 1.17)	0.138
log(PAPP.A.corrected.MoM)	0.62 (0.4 - 0.96)	<0.05
NOTCH bilaterale 20 s.g.	3.34 (1.33 - 8.44)	<0.05

Grafico predittività del modello

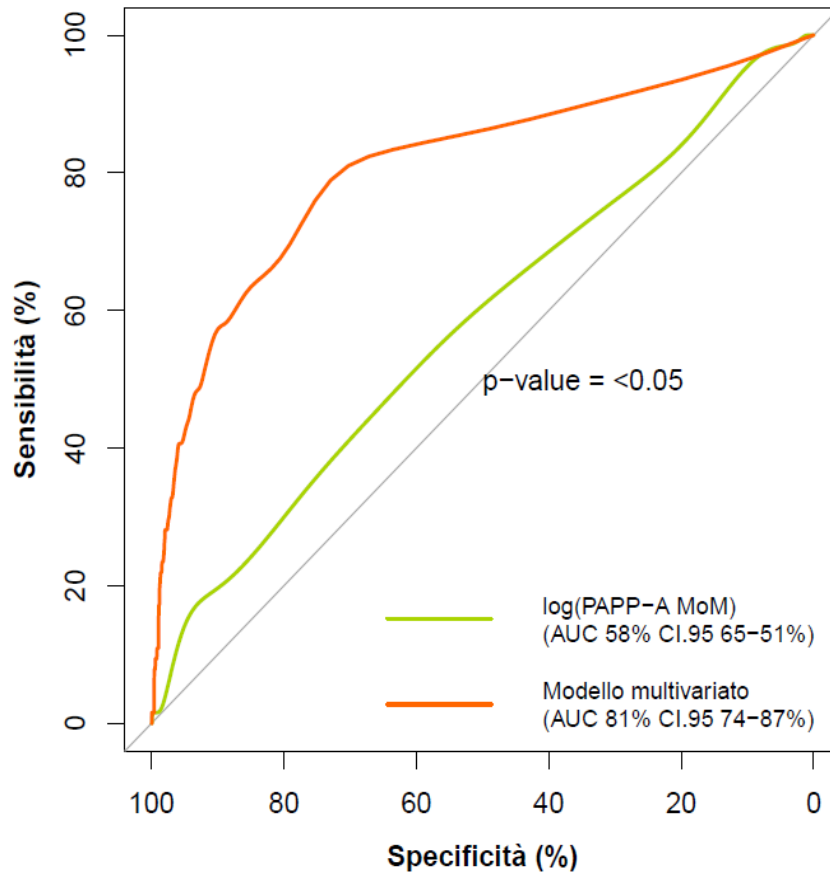


Tabella 9- Modello multivariato predittivo per early preeclampsia (<34 sg)

	OR (IC95%)	p
Africa Sub-sahariana	8.47 (1.55 - 46.31)	<0.05
Età materna	1.18 (1.02 - 1.37)	<0.05
DM pre-gestazionale	22.25 (2.03 - 244.11)	<0.05
Diploma universitario materno	0.57 (0.11 - 2.87)	0.494
log(PAPP.A.corrected.MoM)	0.47 (0.16 - 1.35)	0.161
NOTCH bilaterale 20 s.g.	24.16 (5.12 - 114.03)	<0.05
fr.β.HCG.corrected.MoM	0.27 (0.06 - 1.22)	0.088
NT.MoM	0.04 (0 - 2.38)	0.125

Grafico relativo alla predittività del modello

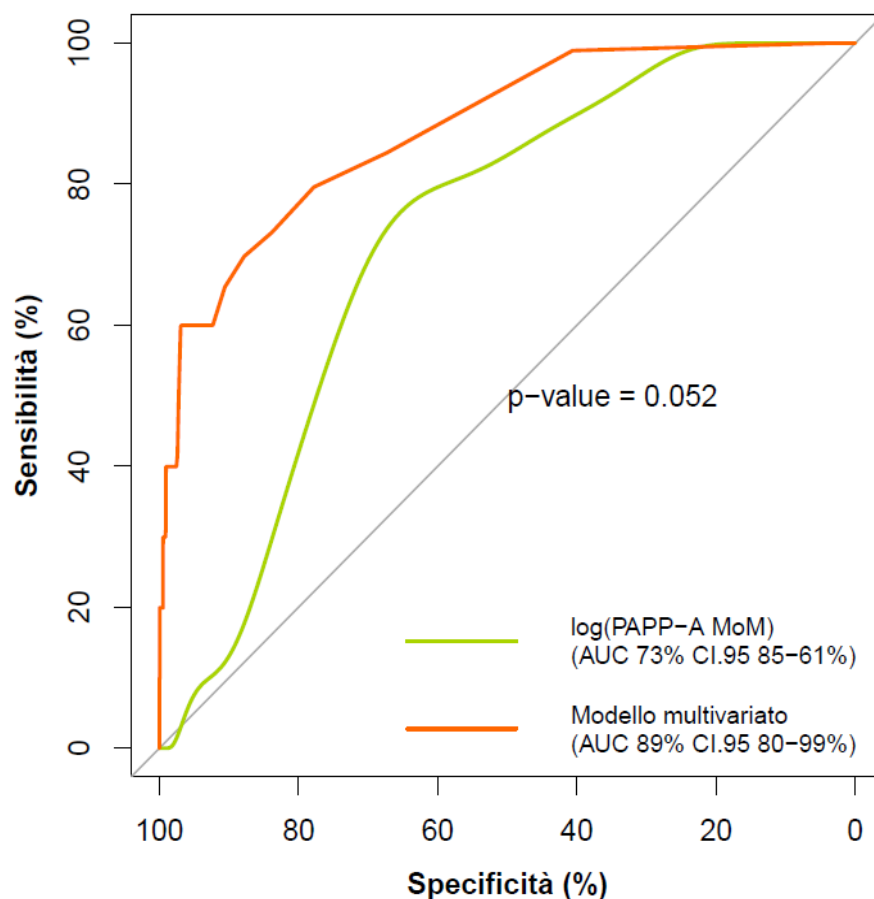


Tabella 10- Modello multivariato predittivo SGA sotto il 5° percentile (esclusi gli IUGR)

	OR (IC95%)	p
Età materna	1.09 (1.03 - 1.15)	<0.05
Nulliparità	1.67 (1.04 - 2.69)	<0.05
BMI pregravidico	0.93 (0.87 - 0.99)	<0.05
Fumo	2.69 (1.19 - 6.07)	<0.05
log(PAPP.A.corrected.MoM)	0.47 (0.31 - 0.7)	<0.05
log(fr.β.HCG.corrected.MoM)	0.77 (0.53 - 1.1)	0.148

Grafico relativo alla predittività del modello

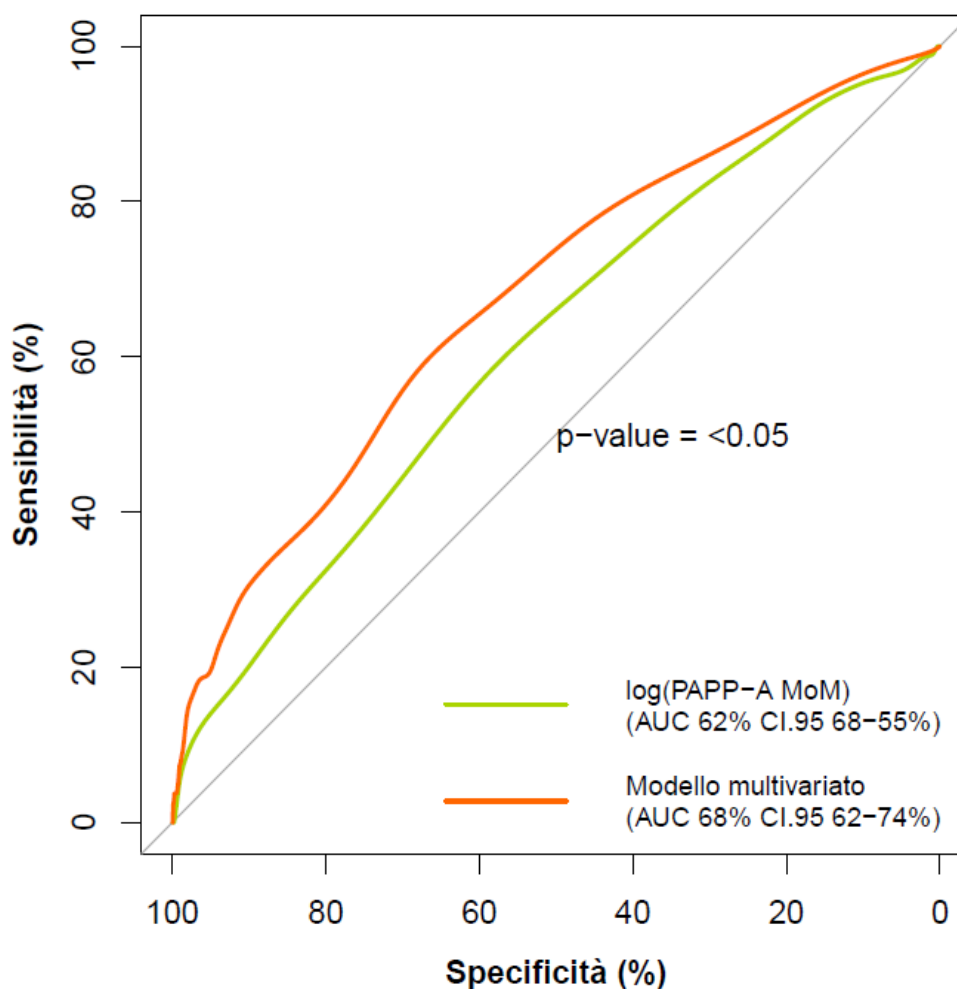
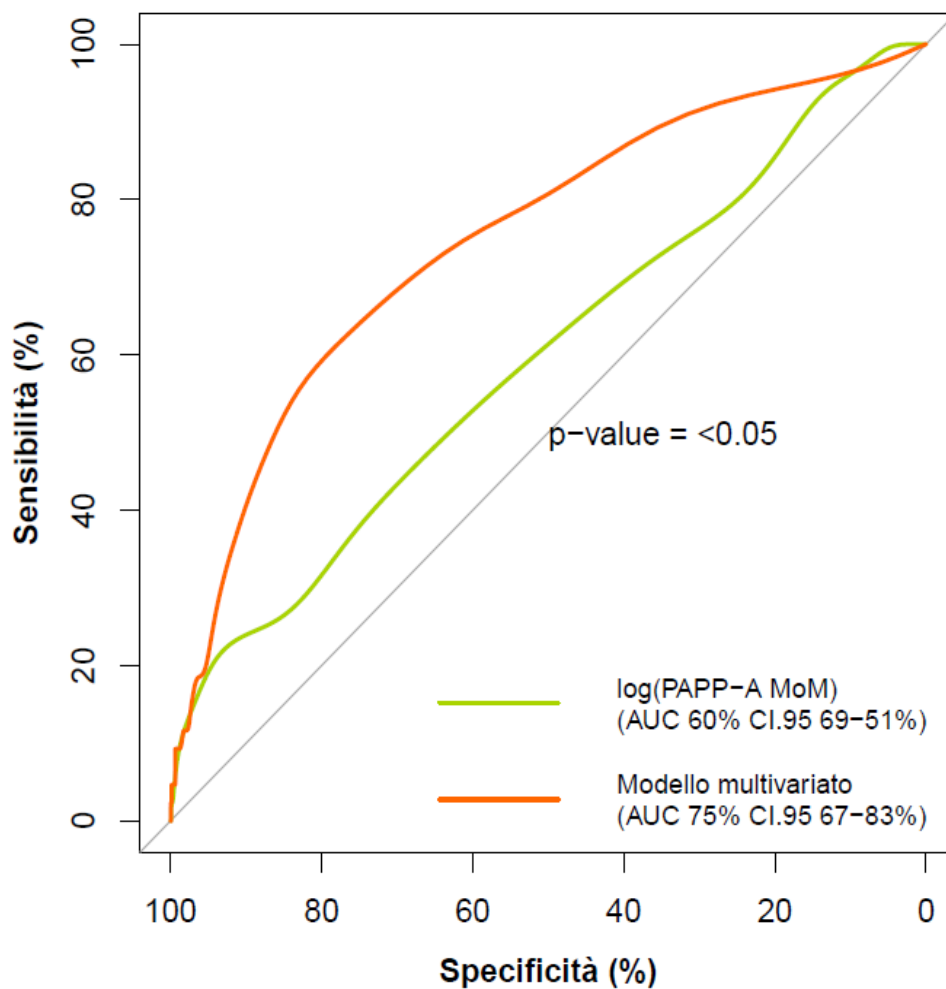


Tabella 11- Modello multivariato predittivo per IUGR

	OR (IC95%)	p
Pre-eclampsia	4.48 (1.37 - 14.61)	<0.05
BMI pregravidico	0.87 (0.78 - 0.96)	<0.05
Africa Sub-Sahariana	5.06 (1.6 - 15.94)	<0.05
NT MoM	0.26 (0.04 - 1.55)	0.140
log(PAPP.A.corrected.MoM)	0.44 (0.26 - 0.76)	<0.05
Notch bilaterale a 20 sg	1.79 (0.5 - 6.43)	0.372
Nulliparità	1.02 (1 - 1.04)	<0.05

Grafico relativo alla predittività del modello



Parte II – Screening mediante markers sierici

Nel corso del biennio 2009-2010 hanno partorito presso la nostra clinica 3252 pazienti con gravidanze singole, tra queste 1186 avevano effettuato il test di screening combinato per le trisomie 13, 18 e 21 presso il nostro centro ed una quota del siero utilizzato per le routinarie analisi era disponibile per l'implementazione del nostro studio.

Di queste 1186 erano disponibili i prelievi di 40 donne con gravidanza singola di cui: 11 controlli con gravidanze normodecorse e peso del neonato adeguato per epoca gestazionale; 14 donne con diagnosi di pre-eclampsia (di cui solo 3 precoci prima della 34 settimana) e 15 donne il cui feto è risultato alla nascita SGA sotto il 10° percentile. Per questo gruppo di pazienti abbiamo effettuato due analisi una per paziente considerando la media delle due misurazioni effettuate, ed una per campione considerando come singolo valore tutte le 80 misurazioni effettuate.

Nella prima analisi, dai 40 pazienti esaminati è emerso che l'unico predittore significativamente associato a SGA (feti piccoli per età gestazionale) è il RBP-4, mentre si notano delle differenze ma non significative per PP13, PAPP-A, estrogeno, progesterone e dislipidemia (Tabella 12-13)

Tabella 12. Analisi per paziente

	AGA	PE	SGA	p
Età materna	32.45 (±5.56)	34.93 (±5.31)	33.27 (±5.75)	0.521
Epoca gestazionale	12.25 (±0.55)	12.35 (±0.76)	12 (±0.51)	0.314
BMI pre-gravidico	23.73 (±3.5)	28.5 (±5.85)	21.33 (±4.84)	<0.05
Free βHCG MoM	1.35 (±1.15)	0.87 (±0.56)	0.77 (±0.4)	0.126
PAPP-A MoM	0.91 (±0.52)	0.86 (±0.42)	0.62 (±0.33)	0.163
PLGF (pg/ml)	5.88 (±0.42)	6.02 (±0.35)	5.85 (±0.52)	0.579
RBP4 (mcg/ml)	15 (±2.93)	14.21 (±3.38)	11.73 (±3.39)	<0.05
PP13 (pg/ml)	13.88 (±4.27)	11.25 (±1.65)	14.52 (±6.75)	0.175
Alfafeto proteina (ng/ml)	14.65 (±5.61)	18.99 (±9.94)	20.53 (±10.68)	0.279
Albumina (g/l)	41.14 (±2.83)	41.19 (±2.89)	41.25 (±3.05)	0.995
Colesterolo (mg/dl)	187.45 (±18.17)	191 (±43.47)	178.27 (±34.95)	0.603
HDL (mg/dl)	64 (±7.73)	59.64 (±10.75)	65.4 (±15.65)	0.434
LDL (mg/dl)	102.62 (±15.15)	105.97 (±37.54)	91.53 (±27.25)	0.385
TRIGLICERIDI (mg/dl)	104.18 (±26.67)	126.93 (±54.47)	106.67 (±36.91)	0.315
Progesterone (nmol/l)	138.95 (±55.21)	115.01 (±32.49)	112.29 (±30.84)	0.203
Log(estradiolo pmol/l)	9 (±0.36)	8.65 (±0.72)	8.78 (±0.34)	0.242
Apo-A (mg/dl)	181.73 (±21.09)	171.71 (±20.99)	181.07 (±36.88)	0.589
Apo-B (mg/dl)	79.59 (±11.16)	87.11 (±28.08)	73.27 (±21.23)	0.249
Apo-B/Apo-A	0.44 (±0.07)	0.52 (±0.22)	0.42 (±0.14)	0.235

Tabella 13- Analisi monovariata e multivariata che considera come variabile dipendente prima le gravidanze con neonato SGA sotto il 10° percentile (A) e poi le gravidanze affette da PE (B). Nel modello multivariato (*) è stata applicata una correzione per epoca gestazionale al dosaggio ed età materna.

	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)(*)	p
A) SGA vs AGA				
RBP4 (mcg/ml)	0.72 (0.53 - 0.97)	<0.05	0.71 (0.51 - 0.98)	<0.05
B) PE vs AGA				
RBP4 (mcg/ml)	0.92 (0.71 - 1.19)	0.530	0.87 (0.65 - 1.17)	0.360

La tabella 14 e 15 elencano i dosaggi dei biomarkers nei tre gruppi nell'analisi per campione.

La RBP4 risulta significativamente inferiore nel gruppo SGA rispetto ai controlli (11.73mcg/ml vs 15) con OR 0.71(0.56 - 0.89).

PP13 risulta significativamente inferiore nel gruppo preeclampsia rispetto ai controlli (11.25 pg/ml vs 13.88) con OR 0.5 (0.31 - 0.81).

Il progesterone risulta significativamente inferiore nel gruppo preeclampsia rispetto ai controlli (115.01 nmol/l vs 138.95) con OR 0.98 (0.96-1). L'estradiolo risulta inferiore ,ai limiti della significatività , nel gruppo preeclampsia rispetto ai controlli.

Tabella 14. Analisi per campione

	AGA	PE	SGA	p
PLGF (pg/ml)	5.88 (±0.41)	6.02 (±0.35)	5.85 (±0.51)	0.321
RBP4 (mcg/ml)	15 (±2.86)	14.21 (±3.32)	11.73 (±3.33)	<0.05
PP13 (pg/ml)	13.88 (±4.17)	11.25 (±1.62)	14.52 (±6.64)	<0.05
Alfafeto proteina (ng/ml)	14.65 (±5.47)	18.99 (±9.75)	20.53 (±10.49)	0.070
Albumina (g/l)	41.14 (±2.76)	41.19 (±2.84)	41.25 (±3)	0.989
Colesterolo (mg/dl)	187.45 (±17.74)	191 (±42.66)	178.27 (±34.34)	0.349
HDL (mg/dl)	64 (±7.55)	59.64 (±10.55)	65.4 (±15.38)	0.176
LDL (mg/dl)	102.62 (±14.79)	105.97 (±36.84)	91.53 (±26.78)	0.137
TRIGLICERIDI (mg/dl)	104.18 (±26.02)	126.93 (±53.45)	106.67 (±36.27)	0.090
Progesterone (nmol/l)	138.95 (±53.88)	115.01 (±31.89)	112.29 (±30.31)	<0.05
Log(estradiolo pmol/l)	9 (±0.35)	8.65 (±0.71)	8.78 (±0.33)	0.052
Apo-A (mg/dl)	181.73 (±20.58)	171.71 (±20.6)	181.07 (±36.24)	0.333
Apo-B (mg/dl)	79.59 (±10.89)	87.11 (±27.55)	73.27 (±20.86)	0.055
Apo-B/Apo-A**	0.44 (±0.07)	0.52 (±0.21)	0.42 (±0.14)	<0.05

** In questo caso la differenza è significativa solo fra SGA e PE, per questa ragione non abbiamo considerato questo valore in analisi multivariata.

Tabella 15- Analisi monovariata e multivariata che considera come variabile

dipendente prima le gravidanze con neonato SGA sotto il 10° percentile (A) e poi le gravidanze affette da PE (B). Nel modello multivariato (*) è stata applicata una correzione per epoca gestazionale al dosaggio ed età materna.

	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
A) SGA vs AGA				
RBP4 (mcg/ml)	0.72 (0.58 - 0.89)	<0.05	0.71 (0.56 - 0.89)	<0.05
B) PE vs AGA				
RBP4 (mcg/ml)	0.92 (0.76 - 1.11)	0.370	0.87 (0.71 - 1.07)	0.200
A) SGA vs AGA				
PP13 (pg/ml)	1.02 (0.92 - 1.13)	0.690	0.97 (0.87 - 1.09)	0.650
B) PE vs AGA				
PP13 (pg/ml)	0.66 (0.48 - 0.92)	<0.05	0.5 (0.31 - 0.81)	<0.05
A) SGA vs AGA				
Progesterone (nmol/l)	0.98 (0.97 - 1)	<0.05	0.98 (0.97 - 1)	0.050
B) PE vs AGA				
Progesterone (nmol/l)	0.99 (0.97 - 1)	0.060	0.98 (0.96 - 1)	<0.05

CONCLUSIONI

Attualmente in Italia, come in molti altri paesi europei, il modello di monitoraggio della gravidanza prevede una valutazione iniziale nel corso del primo trimestre e poi un incremento di frequenza di controlli all'aumentare dell'età gestazionale.

I controlli inclusi nel programma di rimborso del sistema sanitario nazionale diventano estremamente ravvicinati in prossimità del parto, epoca a maggior rischio di manifestazioni patologiche

Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi per quanto riguarda la comprensione, la diagnosi ed il management della gravidanza. Particolarmente attivi sono i gruppi del professor Romero (Detroit) e professor Nicholaides (Londra). Opinione di quest'ultimo è la possibilità di capovolgere l'attuale sistema piramidale delle cure in gravidanza sulla base della capacità di predire l'insorgenza in gravidanza di patologie ipertensive, IUGR, parto pretermine etc (Fig 1). Ciò prevede l'individuazione di gruppi ad alto rischio di patologia ostetrica da sottoporre a monitoraggio intensivo e a misure profilattiche. Nel caso della patologia preclamptica, la metanalisi di Bujold (129) dimostra l'efficacia dell'aspirina nel prevenire pre-eclampsia e IUGR se assunta dal primo trimestre di gravidanza in particolare prima della sedicesima settimana di gravidanza.

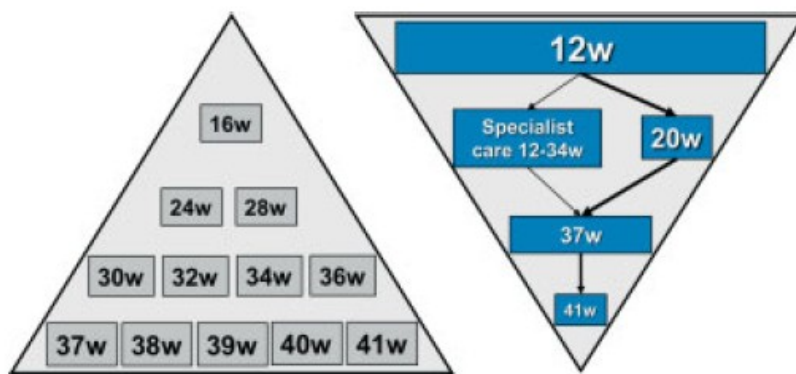


Figura 1

Analogamente a quanto accaduto con lo screening delle cromosomopatie, si sta cercando di affinare l'accuratezza diagnostica della raccolta anamnestica con lo studio di marcatori precoci (preclinici) di malattia nel siero materno. Diverse molecole sono state indicate come promettenti marcatori di patologia, ma, al momento, ancora nessuna ha trovato sicura applicazione clinica.

Il nostro studio è stato volto a perfezionare degli algoritmi per la predizione del rischio di preeclampsia e si compone di 2 parti

Nella **prima parte dello studio**, condotta su 3623 pazienti abbiamo valutato il ruolo dei fattori anamnestici e di un marcatore utilizzato di routine nello studio delle cromosomopatie, PAPP-A, nella predizione del rischio di preeclampsia.

Sono state incluse le seguenti 5 categorie ostetriche: la preeclampsia, con differenziazione tra precoce e tardiva, i feti SGA (piccoli per epoca) con differenziazione rispetto ai feti IUGR (ritardo di crescita fetale) e una categoria di popolazione con gravidanza ad evoluzione fisiologica, definita come popolazione di controllo. Tale suddivisione permette di stratificare il rischio di complicanze ed eventualmente quindi la necessità di intervenire diversamente tra le due categorie di pazienti che presentano un outcome ostetrico nettamente diverso. È noto infatti che soprattutto le forme precoci di preeclampsia (a comparsa < 34 settimane gestazionali) evolvono spesso in forme severe di preeclampsia, frequentemente associate ad importanti complicazioni sia materne che fetali e richiedenti un parto prematuro. Analogamente, sono i neonati IUGR a rappresentare la categoria a maggior rischio di complicanze tra i neonati di basso peso alla nascita, sebbene anche gli stessi SGA necessitino di più intensivi controlli clinici rispetto alla popolazione di controllo.

La percentuale di preeclampsia sulla nostra popolazione di 3623 pazienti è stata del 2%, inferiore alle medie riportate in letteratura (2), proprio perché si tratta di una popolazione selezionata sulla base dell'accesso allo screening biochimico del primo trimestre, che esclude per esempio una buona percentuale di pazienti extracomunitarie o di età più avanzata che si sottopongono in prima battuta all'amniocentesi.

Su questa popolazione di donne abbiamo valutato innanzitutto i fattori di rischio anamnestici per preeclampsia ribadendo il ruolo dell'obesità e dell'alterazione del metabolismo glucidico, rispettivamente OR 1.19 (1.14 - 1.24) e 4.71 (1.34 - 16.62). Nella seconda parte dello studio abbiamo evidenziato anche un ruolo della dislipidemia.

Recentemente è stato riportato che gli score metabolici sono indipendentemente associati con lo sviluppo di preeclampsia, in particolare severa, in due grossi studi caso-controllo (130-131). Infatti molti dei fattori che identificano la sindrome metabolica sono fattori di rischio per preeclampsia: obesità viscerale, insulino-resistenza, dislipidemia e ipertensione

Uno studio del 2007(132) riporta su una coorte di 38.000 donne un effetto dose risposta tra BMI pre-gravidico e preeclampsia, con OR di 1.7 e 3.4 per BMI rispettivamente di 25 e 30. Il rischio aumenta nelle forme severe e nella razza nera.

Risultati simili sono riportati da Ovensen e in un nostro studio del 2011 (23,26).

Lu (133) riporta inoltre una prevalenza di sindrome metabolica fino al 27% in donne con storia di preeclampsia a 1-3 anni dal parto, rispetto al 7% della popolazione generale cinese. Gli stessi risultati compaiono nel lavoro di Smith (134). L'obesità pre-gravidica e attuale è un fattore di rischio indipendente per sindrome metabolica.

Questi dati indicano che una suscettibilità subclinica a una futura sindrome metabolica può predisporre le donne a preeclampsia e che la preeclampsia

probabilmente accelera la disfunzione metabolica, attraverso la disfunzione endoteliale, portando a manifestazioni precoci a poca distanza dalla gravidanza.

Questo meccanismo viene identificato nel “modello modificato a 2 step della Preeclampsia”(135).

Il fatto che tali differenze scompaiano nelle forme ad insorgenza precoce, ribadisce il concetto di una verosimile differente eziopatogenesi tra le due forme (9), essendo quest'ultima maggiormente svincolata da fattori metabolici e prevalentemente legata a fattori genetici-immunologici.

Il ruolo della PAPP-A nella predizione del rischio di preeclampsia viene ribadito nel nostro studio su 3623 donne con valori di PAPP-A MoM significativamente inferiori ($p < 0.05$) nella preeclampsia (0.9), soprattutto ad esordio precoce(0.6), rispetto ai controlli (1) e risulta significativamente più bassa anche in IUGR e SGA (0.8) con OR rispettivamente: OR 0.62 (0.4 - 0.96), AUC 81% CI 74-87; OR 0.47 (0.16 - 1.35), AUC 89% CI 80-99%; OR 0.47 (0.31 - 0.7) AUC 68% CI 62-74%; OR 0.44 (0.26 - 0.76) AUC 75% CI 67-83%.

Studi precedenti hanno evidenziato che bassi valori di PAPP-A nel primo trimestre sono associati con aumentato rischio di preeclampsia particolarmente ad esordio precoce, ma con valore di detection rate bassa, tra il 20 e il 40% (111,113,115, 136-138).

I nostri dati sono in accordo con quelli di Poon e Nicolaides del 2009 (114) su 8000 pazienti di cui 150 destinate a sviluppare preeclampsia. In questo studio i valori di PAPP-A MoM nel I trimestre sono rispettivamente di 1 nei controlli, di 0.55 nelle forme precoci e di 0.9 nelle forme tardive. Viene inoltre evidenziata una associazione tra PAPP-A sierica e incrementati indici di resistenza nelle arterie uterine. Nel nostro studio questa associazione viene stabilita con la flussimetria uterina eseguita nel II trimestre.

Solo 20% dei casi di preeclampsia precoce e il 6% delle forme tardive aveva valori PAPP-A < 5° percentile ed inoltre il rischio legato al dosaggio di PAPP-A risulta influenzato dalle caratteristiche materne

Le stesse considerazioni si evincono per l'associazione di PAPP-A e ritardo di crescita fetale/feti piccoli per età gestazionale (138-140)

In conclusione bassi valori di PAPP-A risultano associati a preeclampsia soprattutto precoce e a ritardo di crescita fetale ma non può isolatamente costituire una metodica di screening.

Nella **seconda parte dello studio** abbiamo cercato pertanto di incrementare la potenza del test utilizzato di routine nello screening delle aneuploidie.

Si è provveduto a restringere il campo di ricerca al dosaggio di alcuni dei marcatori sierici di maggiore interesse in un numero relativamente limitato ma sufficiente di campioni ematici materni. Ciò è stato fatto allo scopo di poter contenere i costi dello studio, soprattutto dovuti all'utilizzo di marcatori anticorpali da dosare con metodo ELISA. Inoltre, anche a causa della scarsità di alcuni tipi di sottopopolazioni di pazienti, le categorie di popolazione sono state ridotte a sole 3: pazienti affette da preeclampsia, incluse le forme precoci e tardive, pazienti con feti SGA (piccoli per epoca), inclusi i feti con IUGR; infine, pazienti con feti AGA (vale a dire adeguati per epoca gestazionale, sono stati scelti come categoria di controllo. In questo caso sono state escluse tutte le pazienti con altre patologie della gravidanza che pur non avevano alcuna influenza sulla crescita fetale.

Lo studio condotto ha considerato l'analisi di alcuni dei marcatori al momento più accreditati per l'esecuzione di un protocollo di screening precoce della preeclampsia e della patologia SGA. Alcuni marcatori sono stati già testati in diversi studi preclinici, altri sono meno noti o correlati a risultati inconcludenti o addirittura

discordanti. Vale la pena di ricordare però come al momento non sia disponibile alcun marcatore sierico con le caratteristiche di accuratezza diagnostica necessaria.

L'analisi da noi eseguita ha portato in evidenza alcuni risultati molto interessanti, in particolare ha permesso di individuare nel RBP4 un marcatore di patologia SGA finora sconosciuto. Ciò, se risultasse confermato in studi successivi su un maggior numero di pazienti, potrebbe essere evidentemente correlato ad importanti risvolti clinici e scientifici.

Il commento ai risultati dei dosaggi dei marcatori oggetto di studio sono esposti di seguito suddivisi per categoria.

Sui 40 campioni nell'analisi per campione abbiamo evidenziato un'associazione tra PP-13 e preeclampsia con valori significativamente inferiori nei casi rispetto ai controlli (11.25 pg/ml vs 13.88) con OR 0.5 (0.31 - 0.81).

PP 13 è una proteina prodotta principalmente dal sinciziotrofoblasto coinvolta nel rimodellamento placentare. Essa lega residui carboidratici della matrice extracellulare ed incrementa il rilascio di prostaglandine coinvolte nel rimodellamento vascolare. Come già descritto nell'introduzione di questa tesi, diversi studi (101-108) hanno analizzato il ruolo di pp-13 nella definizione del rischio di preeclampsia riconoscendone una detection rate fino all'80% principalmente per le forme precoci.

In uno studio recente su 88 donne affette da preeclampsia precoce, Wortelboer (108), riporta una detection rate del 30% per PP-13, che migliora in caso di associazione con feti piccoli per epoca gestazionale. Tale sensibilità è più bassa rispetto ai dati della letteratura ma aumenta al 50% circa in combinazione con Placental Growth Factor (PIGF). Quest'ultimo, fattore proangiogenico è l'unico fattore di questa categoria ad essere stato dosato nel I trimestre. La DR per PIGF nel I trimestre per la predizione di preeclampsia early onset varia negli studi dal 40 al 60%, mentre risulta del 30% per preeclampsia late onset(48, 108-110, 120-122,124-

126).

Nel nostro studio non emergono differenze significative tra casi , controlli e piccoli per età gestazionale in termini di PIGF, probabilmente a causa della scarsa numerosità del campione in esame.

Interessanti sono i risultati relativi al progesterone e a RBP-4.

Livelli di progesterone sono risultati significativamente ridotti nei casi di preeclampsia rispetto ai controlli (115.01 nmol/l vs 138.95) con OR 0.98 (0.96-1).

In letteratura non vi sono dati circa il I trimestre di gravidanza. Tamimi nel 2003 (141) evidenziava dei valori superiori nel II e III trimestre iniziale nelle donne successivamente affette da preeclampsia. Il progesterone, così come l'estrogeno, incrementa durante tutta la gravidanza, raggiungendo un picco al termine, dopo un iniziale plateau o caduta intorno alla 7-9° settimana gestazionale durante il periodo dello shift luteo-placentare (53). Le concentrazioni placentari verosimilmente sono molto più elevate rispetto a quelle sieriche (142). Mentre le funzioni del progesterone nel mantenimento della gravidanza sono ben note, c'è una limitata letteratura disponibile sui suoi effetti a livello d'invasione del trofoblasto extravillioso. Poiché il progesterone influenza il sinciziotrofoblasto e la decidua e che si trova ad elevate concentrazioni all'interfaccia materno-fetale, è ragionevole ipotizzare che possa giocare un ruolo nell'invasione trofoblastica e nel rimodellamento vascolare. La decidualizzazione e il reclutamento di cellule natural killer, che si verificano entrambi durante il primo step del rimodellamento associato alla decidua, sono regolate dal progesterone (142). È stato inoltre dimostrata un'azione antiapoptotica su una linea cellulare di trofoblasto extravillioso HTR8/Svneo, promuovendone l'infiltrazione all'interno di tessuto materno (143).

Questi dati indicano quindi un possibile ruolo del progesterone nella regolazione e promozione dell'invasione trofoblastica.

Infine, nel nostro lavoro si è riscontrato che ridotti valori di RBP-4 nel I trimestre di gravidanza aumentano il rischio di partorire un feto piccolo per età gestazionale e ciò viene dimostrato nell'analisi per paziente e in quella per campione con (11.73mcg/ml vs 15) con OR 0.71(0.56 - 0.89). Invece non si riscontra una differenza significativa nei casi di preeclampsia.

I dati in letteratura circa RBP-4 ed esiti della gravidanza sono pochi e discordanti e si riferiscono comunque a dosaggi eseguiti in fase conclamata di patologia ipertensiva.

In un lavoro del 2009 Stepan (98) non riscontra differenze statisticamente significative tra pazienti preeclamptiche (n 16) e controlli (n 20) durante il III trimestre di gestazione.

Alle stesse conclusioni giunge Masuyama in uno studio pubblicato nel 2011 (96). In realtà vengono però riscontrati valori statisticamente più alti nelle donne obese con preeclampsia tardiva rispetto alle donne sovrappeso con gravidanza normale e rispetto alle gravide normopeso affette da preeclampsia tardiva. Non vi erano, invece, differenze significative tra le donne affette da preeclampsia precoce. Questi dati suggeriscono un ruolo di RBP4 nella patogenesi della preeclampsia tardiva nelle donne obese attraverso il meccanismo dell'insulino-resistenza.

Seol (2011) (97) ha riscontrato valori significativamente inferiori nel siero materno e di cordone ombelicale su 16 donne affette da preeclampsia tardiva rispetto a 16 controlli. I risultati sono discordanti ma viene dedotto un possibile ruolo compensatorio nella riduzione di RBP4 al fine di migliorare l'insulino-resistenza in queste donne.

L'effetto di RBP-4 sulla crescita e sul peso fetale viene considerato solo nel lavoro di Vaisbuch e Romero (95) pubblicato nel 2010 in cui non si riscontrano differenze significative tra controlli (n 134) e gravidanze con feti piccoli per età gestazionale (n 28) o morti fetali (n 37). Invece le concentrazioni di RBP4 erano significativamente

più alte nelle pazienti preeclampatiche (n 104) rispetto ai controlli, e soprattutto nelle forme early onset. Un dato significativo era che la concentrazione sierica non correlava con il BMI pre-gravidico e con l'età gestazionale.

Le adipokine, quali leptina, adiponectina, resistina, sono citochine derivate dagli adipociti, implicate nell'omeostasi glucidica nell'insulino resistenza in donne gravide e non, fornendo un collegamento tra obesità-insulino-resistenza e diabete mellito II e sindrome metabolica, a sua volta correlata, come già descritto, ai disordini ipertensivi in gravidanza (144-145)

RBP4, trasportatore del retinolo, è stata inserita di recente nella famiglia delle adipokine (146). Prodotta dal fegato, ma anche a livello adipocitario, verosimilmente si ritiene possa essere sintetizzata a livello placentare. Si ritiene avere un ruolo nell'obesità legata ad insulino-resistenza con valori superiori nei pazienti diabetici o destinati ad esserlo (146). Riveste inoltre un ruolo nei processi infiammatori (147).

Limiti dello studio

Uno dei maggiori limiti dell'attuale studio è la relativa scarsità di precisione nella definizione delle categorie di patologie indagate durante la fase II. In particolare, nella categoria di popolazione PE non è presente una differenziazione tra preeclampsia precoce e tardiva. Inoltre, nella categoria di popolazione SGA (piccoli per epoca gestazionale), manca una differenziazione tra categoria di popolazione SGA e IUGR(ritardo di crescita fetale). Ciò non è stato possibile a causa della scarsità di casi a disposizione delle suddette sub-categorie e degli alti costi della serie di anticorpi testati.

Direzioni Future

RBP4 e le altre molecole del complesso TTR-RBP4-Retinolo-T4.

Studiare meglio il ruolo di questo nuovo marcatore nell'eziopatogenesi della patologia SGA. In particolare il metabolismo di questa molecola durante la

gravidanza fisiologica e complicata da SGA e, presumibilmente, da early onset preeclampsia. RBP4 viene interamente veicolata da TTR, per cui è importante verificare se alla base delle alterazioni di RBP4 ci sia un'alterazione della concentrazione di TTR o, eventualmente, della concentrazione delle componenti mono- e di-meriche TTR e nelle loro caratteristiche di ossidazione. Inoltre, è importante verificare l'influenza di RBP4 nel trasporto del retinolo, molecola fondamentale in tutti i processi di differenziazione cellulare. Questo si può fare andando a dosare l'entità di RBP4 legata al retinolo e confrontarla con quella del forma libera. Infine, è noto che il legame di T4 e di RBP4 stesso influenza la stabilità del tetramero TTR e, di conseguenza, della funzionalità stessa di TTR come molecola di trasporto di T4 e di RBP4. Per questo motivo, sarà necessario dosare la concentrazione di T4 nel sangue materno e, per completezza, di TSH in quanto suo ormone regolatore.

È in corso a tale scopo un ampliamento della popolazione oggetto di studio utilizzando un pool di campioni di siero materno, equiparabile a quello utilizzato in questo studio, proveniente da pazienti afferenti alla clinica Universitaria di Münster (Germania). Tale collaborazione dovrebbe permettere di aumentare il numero di casi appartenenti alle diverse sub-categorie di interesse e quindi ottenere la necessaria precisione nella definizione delle categorie oggetto di studio. Infine, la riduzione del numero di marcatori di patologia gravidica al solo RBP4 permetterebbe di limitare gli alti costi legati all'uso di anticorpi monoclonali.

Altre categorie di popolazione

Di grande interesse è anche l'indagine di ulteriori categorie di popolazione oltre alle suddette, soprattutto la sindrome HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count) e disturbi del metabolismo glicemico (diabete mellito e gestazionale). La HELLP è considerata una patologie della gravidanza in gran parte ad

eziopatogenesi sconosciuta, legata in molti casi all'insorgenza di PE, ma spesso caratterizzata da forme di presentazione eterogenea e spesso a comparsa fulminante ed imprevedibile. Attualmente pochissimi studi si sono interessati alla definizioni di marcatori biochimici nel sangue materno al termine del primo trimestre di gravidanza. Evidenziare eventuali marcatori precoci potrebbe aiutare ad eseguire una diagnosi molto precoce ed ad evidenziare eventuali differenze eziopatogenetiche.

Anche l'indagine delle patologie del metabolismo glicemico, in particolare durante le prime fasi della gravidanza, sarebbe molto interessante, in particolare per il diabete gestazionale, sia la forma più grave insulinodipendente, sia per quella più lieve non insulinodipendente. Ciò soprattutto andando a testare il RBP4 che è stato solo recentemente indicato come nuova adipochina con funzione di regolazione del metabolismo glucidico. Al momento già diversi studi ne indicano un importante ruolo nella patogenesi del diabete gestazionale, tuttavia, nessuno studio è stato finora eseguito durante le fasi precoci della gravidanza. In questo caso sarebbe possibile fare diagnosi molto prima degli abituali test diagnostici tutt'ora disponibili (curva da carico di glucosio - OGTT), molto spesso falsamente negativi nelle fase precoci della gravidanza. Ciò avrebbe il vantaggio di screenare con un solo marker le maggiori patologie della gravidanza, tutte in gran parte riconducibili ad un anomalo processo di placentazione.

Infine, è possibile ipotizzare una possibile applicazione del dosaggio del marcatore RBP4 nello screening delle cromosomopatie, in particolare la Trisomia 21. È noto che diversi marcatori di patologia gravidica, in particolare di preclampsia e IUGR, sono alterati anche nel caso di cromosomopatie. È questo il caso per esempio di PAPP-A e PP13. È ipotizzabile in tal senso la presenza di precoci alterazioni nel processo di placentazione comuni a questi differenti tipi di patologia gravidica.

Sarebbe quindi possibile un possibile utilizzare di RBP4 come ulteriore marcatore sierico di cromosomopatie, con un eventuale miglioramento del potere diagnostico degli attuali test sierici in uso.

BIBLIOGRAFIA

1. Dekker GA, Sibai BM. Cardiovascular Pathophysiology of Hypertensive Disorders in Pregnancy in medical Therapy in Pregnancy. Appleton & Lange, Stamford (CT), 1998.
2. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ et al. Pregnancy outcomes in healthy nullipara who developed hypertension. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 24-28.
3. Berg CJ, Chang J, Callaghan WM et al. Pregnancy-related mortality in the USA 1991-1997. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 289-294.
4. Funai EF, Friedlander Y, Patiel O et al. Long term mortality after preeclampsia. *Epidemiology* 2005; 16: 206-215.
5. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, van Assche A, Moutquin J. The classification and diagnosis of Hypertensive Disorders of Pregnancy: Statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertension Pregnancy*, 2001; 20 (1): IX-XIV.
6. NHBPEP Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22.
7. ACOG practice bulletin, number 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 159-167
8. Associazione Italiana Preeclampsia (AIPE). Ed. Linee Guida per il management dell'ipertensione in gravidanza. Cento (FE) Italy: Editeam Gruppo Editoriale 2007.
9. Huppertz B et al. Placental origins of preeclampsia: Challenging the current

- hypothesis. Hypertension 2008; 51: 970-975
10. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: A renal perspective. *Kidney Int.* 2005; 67: 2101-2113.
 11. Driul L, Londero A, Bertozzi S, Peressini L, Vanin M, D'Aiotti V, Fruscalzo A, Biasioli A, Salvador S, Furlan R, Petrovec M, Marchesoni D. Pregnancy outcome and neonatal health by mothers aged 40 years and over. *Journal of Medicine and Medical Sciences* 2010 1(5), 148-155
 12. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of preeclampsia. *BMJ* 1998; 316: 1343-1347.
 13. Redman CWG, Sacks. Preeclampsia, an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 499-506.
 14. Samadi AR, Mayberry RM, Zaidi AA, Pleasant JC, McGhee N Jr, Rice RJ. Maternal hypertension and associated pregnancy complications among African-American and other women in the United States. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 557-563
 15. Driul L, Fruscalzo A, Londero A, Tonizzo G, Biasioli A, Bertozzi S, Marchesoni D. Fetal Weight and Maternal Ethnicity: Our Experience in a Region with a High Immigration Rate. *Ultrasound Med Biol* 2011;37(8), S75--.
 16. Roberts CL, Ford JB, Algert CS, Antonsen S, Chalmers J, Cnattingius S et al. Population-based trends in pregnancy hypertension and pre-eclampsia: an international comparative study. *BMJ Open.* 2011; 1(1): e000101
 17. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010 21;:631-44

18. Robillard PY, Dekker GA, Hulsey TC. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 84: 37-41.
19. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-1375
20. Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 2000; 107: 1410-1416.
21. Zhang J, Troendle JF, Levine RJ. Risks of hypertensive disorders in the second pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001 ; 15: 226-231.
22. Fruscalzo A, Bertozzi S, Londero AP, Biasioli A, Driul L, Kiesel L, Marchesoni D. Menstrual abnormalities and predisposition to pregnancy-related hypertensive disorders: a retrospective study. *Gynecol Endocrinol* 2010;26: 445-450
23. Ovesen P, Rasmussen S, Kesmodel U. Effect of prepregnancy maternal overweight and obesity on pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. 2011;118:305-12
24. Bosio PM, McKenna PJ, Conroy R, O'Herlihy C. Maternal central hemodynamics in hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 978-984.
25. Yamamoto S, Douchi T, Yoshimitsu N, Nakae M, Nagata T. Waist to hip circumference ratio as a significant predictor of preeclampsia, irrespective of overall adiposity. *J Obstet Gynecol Res* 2001; 27: 27-31.
26. Driul L, Tonutti L, Londero A. P, Da Riolo R, Biasioli A, Bertozzi S, Marchesoni

- D. Bmi pregravidico e complicazioni della gravidanza (abstract in Atti XVIII Congresso Nazionale Associazione Medici Diabetologi 2011.
27. Spencer K , Yu CK, Rembouskos G, Bindra R, Nicolaides KH. First trimester sex hormone binding globulin and subsequent development of preeclampsia or other adverse pregnancy outcomes. *Hypertens Pregnancy* 2005; 24: 303-311.
28. Carpenter Mw. Gestational Diabetes, pregnancy hypertension and late vascular disease. *Diabetes Care* 2007; 30: S246-50
29. Londero, A. P.; Biasizzo, J.; Bertozzi, S.; Fruscalzo, A.; Salvador, S.; Biasioli, A.; Driul, L.; Curcio, F. & Marchesoni, D. (2010), 'Analysis of amniotic fluid and maternal plasma concentrations of glucose, insulin, adiponectin and leptin at the 16th gestational week in women who will develop gestational diabetes mellitus: a case-control study (ABSTRACT)', *Arch Gynecol Obstet* 282(Suppl 1), S4
30. Driul L, Londero AP, Citossi A, Peressini L, Fruscalzo A, Salvador, S, Biasioli A, Zoratti R, Bertozzi S, Tonutti L, Marchesoni D. Neonatal and maternal outcomes by gestational diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a retrospective analysis of our 6-years experience. *Arch Gynecol Obstet* 2010 282(Suppl 1), S73
31. Holmes VA, Young IS, Patterson CC, Pearson DW, Walker JD, Maresh MJ, McCance DR; Diabetes and Pre-eclampsia Intervention Trial Study Group. Optimal glycemic control, pre-eclampsia, and gestational hypertension in women with type 1 diabetes in the diabetes and pre-eclampsia intervention trial. *Diabetes Care*. 2011 Aug;34:1683-8.
32. Rath W. Pre-eclampsia and inherited thrombophilia: a reappraisal. *Semin*

Thromb Hemost. 2011 37:118-24

33. Middeldorp S Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? J Thromb Haemost 2007; 5: 276-282.
34. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA; Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. Br J Haematol 2006; 132: 171-196.
35. Kahn SR, Platt R, McNamara H, Rozen R, Chen MF, Genest J Jr, Goulet L, Lydon J, Seguin L, Dassa C, Masse A, Asselin G, Benjamin A, Miner L, Ghanem A, Kramer MS.. Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study. Am J Obstet Gynecol 2009; 200: 151.e1-9.
36. Kocher O, Cirovic C, Malynn E, Rowland CM, Bare LA, Young BA, Henslee JG, Laffler TG, Huff JB, Kruskall MS, Wong G, Bauer KA.. Obstetrics complications in patients with hereditary thrombophilia indentified using the LCx microparticle enzyme immunoassay: a controlled study of 5000 patients. Am J Clin Pathol 2007; 127: 68-75.
37. Skjarven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Rønning T, Irgens LM, Lie RT. Recurrence of preeclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. BMJ 2005; 331-877.
38. Valensise H, Vasapollo B, Lazzarin N . Anticorpi non organo specifici e gravidanza: definizione e fisiopatologia. Riv It Ost Gin 2006 ;10: 516-520.
39. Sibai BM Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G,

- Dombrowski M, Roberts J, McNellis D.. 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* 2000; 182: 938-942.
40. Sattar N, Bedomir A, Berry C, Shepherd J, Greer IA, Packard CJ. Lipoprotein subfraction concentrations in preeclampsia: pathogenic parallels to atherosclerosis. *Obstet Gynecol* 1997; 89:403-8.
41. Mylonas C , Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13: 295-309.
42. Beck J , Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 1996; 67: 1123-1137.
43. Beck JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbacher S. Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J* 1999; 138: 528-533.
44. Katz J, Chaushu G, Sharabi Y. On the association between hypercholesterolemia, cardiovascular disease and severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 865-868.
45. Boggess KA , Lieff S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 227-231.
46. Zamudio S . High altitude hypoxia and preeclampsia. *Front Biosci* 2007; 12: 2967-2977.
47. Conde-Agudelo A , Belizan JM. Risk factors for preeclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *Br J Obstet Gynecol* 2000; 107: 75-83.

48. 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. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Medicine* 2004; 350: 672-683.
49. Levine RJ Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Medicine* 2006; 355: 992–1005.
50. Knofler M, Pollheimer J. IFPA Award in placentology lecture: molecular regulation of human trophoblastic invasion. *Placenta* 2011, in press doi: 10.1016/j.placenta.2011.09.019
51. Pijnenborg R Trophoblast invasion in preeclampsia and other pregnancy disorders. In: Lyall F, Belfort M. Ed. *Preeclampsia: etiology and clinical practice*. Cambridge UK: Cambridge University Press 2007: 3-19.
52. Pijnenborg R., Vercruysse L., Brosens I. Deep placentation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011; 25: 273-285
53. Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol* 2011, in press, doi: 10.1016/j.mce.2011.10.014
54. Pijnenborg R , Vercruysse L., Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-958.
55. Ramma w, Ahmed A. Is the inflammation the cause of the pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans* 2011;39: 1619-1627
56. Ayuk Pt, Matijevic R. Placental ischaemia is a consequence rather than a

- cause of pre-eclampsia. *Med Hypotheses*. 2006;67:792-5.
57. Huppertz B. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 353–362.
58. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von Dadelszen P. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2006; 27: 56–61.
59. Krysko DV, D'Herde K, Dandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*. 2006; 11: 1709–1726.
60. Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast microparticles preparations on endothelial cells. *Placenta*. 2005;26:59–66.
61. [Than NG](#), [Romero R](#), [Hillermann R](#), [Cozzi V](#), [Nie G](#), [Huppertz B](#). Prediction of preeclampsia - a workshop report. *B. Placenta* 2008 ;29 Suppl A:S83-5.
62. [Gauster M](#), [Moser G](#), [Orendi K](#), [Huppertz B](#). Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta*. 2009 ;30 Suppl A:S49-54.
63. [Huppertz B](#), [Sammar M](#), [Chefetz I](#), [Neumaier-Wagner P](#), [Bartz C](#), [Meiri H](#). Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia *Fetal Diagn Ther*. 2008;24(3):230-6. Epub 2008 Aug 28.
64. [Boldt HB](#), [Conover CA](#). Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res*. 2007 ;17:10-8.
65. Kirkegaard I, Ulbjerg N, Oxvig C. biology of pregnancy-associated plasma protein A in relation to prenatal diagnosis: an overview. *Acta ObstetGynecol*

2010;89:118-1125

66. Carr DB, McDonald GB, Brateng D, Desai M, Thach CT, Easterling TR. The relationship between hemodynamics and inflammatory activation in women at risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:1109-1116.
67. Tjoa ML, Levine RJ, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Front Biosci* 2007 ;12:2395–2402
68. Hawfield A , Freedman BI. Preeclampsia: the pivotal role of the placenta in its pathophysiology and markers for early detection. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009; 3: 65-73.
69. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003 ;111:649-58
70. Kabbavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Jan 1;21(1):60-5
71. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, Jank A, Kribs A, Cornely OA, Kreyszig C, Hemphill L, Rigby AC, Khedkar S, Lindner TH, Mallmann P, Stepan H, Karumanchi SA, Benzing T. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation.* 2011 Aug 23;124(8):940-50
72. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y,

- Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA.. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Med* 2006; 12: 642-649.
73. Rajmakers MTM . The role of oxidative stress in preeclampsia. In: Lyall F, Belfort M. Ed. *Preeclampsia: etiology and clinical practice*. Cambridge UK: Cambridge University Press 2007: 121-137.
74. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000; 157: 2111-2122.
75. Burton GJ et al. Hypoxia-reoxygenation ; a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Maternal Med. Rev.* 2003; 14: 97-117.
76. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 2003 ; 34:1265-75.
77. Dechend R [Viedt C](#), [Müller DN](#), [Ugele B](#), [Brandes RP](#), [Wallukat G](#), [Park JK](#), [Janke J](#), [Barta P](#), [Theuer J](#), [Fiebeler A](#), [Homuth V](#), [Dietz R](#), [Haller H](#), [Kreuzer J](#), [Luft FC](#). AT1 receptor agonist antibodies from preeclamptic patients stimulate NADH oxidase. *Circulation* 2003; 107: 1632-1639
78. Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003; 162: 637-643.

79. Redman CWG, Sargent II. Placental debris, oxidative stress and preeclampsia. 2000; 21: 597-602.
80. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. Placenta. 2009 ;30 Suppl A:S55-65.
81. Redman CWG, Sargent II. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. Placenta. 2009 ;30 Suppl A:S38-42.
82. Slowinski T [Neumayer HH](#), [Stolze T](#), [Gossing G](#), [Halle H](#), [Hocher B](#). Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. Clin Sci 2002; 103: 446s-449s.
83. Ward K Searching for genetic factors underlying pre-preeclampsia recent progress and persistent challenges. Minerva Gynecol 2008; 60: 399-419.
84. GOPEC Consortium Disentangling fetal and maternal susceptibility for preeclampsia: a British multicenter candidate-gene study. Am J Hum Genet 2005; 77: 127-131.
85. [Williams PJ](#), [Pipkin FB](#). Best The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011;25:405-17.
86. Chappell S, Morgan L. Searching for genetic clues to the causes of preeclampsia. Clin Sci 2006; 110: 443-458.
87. Found SA. Bridging global gene expression candidates in first trimester placentas with susceptibility loci from linkage studies of preeclampsia. J Perinat Med. 2011 ;39:361-8
88. Nishizawa H, [Pryor-Koishi K](#), [Kato T](#), [Kowa H](#), [Kurahashi H](#), [Udagawa Y](#).

- Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe preeclampsia. *Placenta* 2007; 28: 487-497
89. Zhou R [Zhu Q](#), [Wang Y](#), [Ren Y](#), [Zhang L](#), [Zhou Y](#). Genomewide oligonucleotide microarray analysis on placentae of preeclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Investing* 2006; 62: 108-114.
90. Hoeg AM, Borup R, Nielsen FC, Sørensen S, Hviid TV. Gene expression profiling of placentas affected by pre-eclampsia. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:787545.
91. [Enquobahrie DA](#), [Meller M](#), [Rice K](#), [Psaty BM](#), [Siscovick DS](#), [Williams MA](#). Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 566.e1-566.e11
92. Hyung SJ, Deroo S, Robinson CV. Retinol and retinol-binding protein stabilize transthyretin via formation of retinol transport complex. *ACS Chem Biol.* 2010;5:1137-46
93. Vascotto C, Salzano AM, D'Ambrosio C, Fruscalzo A, Marchesoni D, di Loreto C, Scaloni A, Tell G, Quadrioglio. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia *FJ Proteome Res.* 2007 ;6:160-70.
94. Fruscalzo A, Biasizzo J, Bortolotti N, Londero A. P, Bertozzi S, Biasioli A, Driul L, Curcio F, Marchesoni D. Incremento del livello del retinolo libero nel liquido amniotico di gravidanze complicate da ipertensione: studio caso-controllo (abstract), in 'Atti del II Congresso Nazionale della Federazione Italiana di Ostetricia e Ginecologia, Torino' 2009
95. [Vaisbuch E](#), [Romero R](#), [Mazaki-Tovi S](#), [Erez O](#), [Kim SK](#), [Chaiworapongsa T](#), [Gotsch F](#), [Than NG](#), [Dong Z](#), [Pacora P](#), [Lamont R](#), [Yeo L](#), [Hassan SS](#), [Kusanovic JP](#). Retinol binding protein 4-a novel association with early-onset

- preeclampsia. J Perinat Med. 2010 ;38:129-39
96. [Masuyama H](#), [Inoue S](#), [Hiramatsu Y](#). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in preeclampsia Endocr J. 2011;58:47-53.
 97. Seol HJ, Kim JW, Kim HJ. Retinol-binding protein-4 is decreased in patients with preeclampsia in comparison with normal pregnant women J Perinat Med. 2011 May;39:287-9.
 98. Stepan H, Ebert T, Schrey S, Reisenbüchler C, Blüher M, Stumvoll M, Kratzsch J, Tönnessen P, Faber R, Fasshauer M. Preliminary report: Serum levels of retinol-binding protein 4 in preeclampsia. Metabolism 2009;58:275-7.
 99. Papageorgiou AT, Yu CKH, Nicolaides KH. The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology 2004; 18: 383-396.
 100. Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ, King JF . WITHDRAWN: Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. Cochrane Database Syst Rev 2007; 2.
 101. [Nicolaides KH](#), [Bindra R](#), [Turan OM](#), [Chafetz I](#), [Sammar M](#), [Meiri H](#), [Tal J](#), [Cuckle HS](#) A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. Ultrasound Obstet Gynecol. 2006;27:13-7
 102. [Chafetz I](#), [Kuhnreich I](#), [Sammar M](#), [Tal Y](#), [Gibor Y](#), [Meiri H](#), [Cuckle H](#), [Wolf M](#). First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol. 2007 Jul;197(1):35.e1-7
 103. Spencer k, Cowans N. J., Chafetz I., Tal J., Meiri H. First-trimester maternal serum pp-13, papp- a and second-trimester uterine artery doppler

- pulsatility index as markers of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2007;29:128-134.
104. R. Gonen, R. Shahar, Y. I. Grimpel, I. Chefetz, M. Sammar, H. Meiri, and Y. Gibor. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: a prospective longitudinal study. *BJOG* 2008, 115 :1465–1472.
105. Romero R, Kusanovic JP, Than NG, Erez O, Gotsch F, Espinoza J, Edwin S, Il Chefetz I, Gomez R, Nien JK, Sammar M, Pineles B, Hassan SH, Meiri, H Tal Y, Kuhnreich Y, Papp Z, Cuckle HS. First- trimester maternal serum pp13 in the risk assessment for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008, 199:122.e1– 122.e11.
106. Khalil A, Nicholas J Cowans, Kevin Spencer, Sergey Goichman, Hamutal Meiri, and Kevin Harrington. First trimester maternal serum placental protein 13 for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk. *Prenat Diagn* 2009, 29:781–789.
107. Odibo AO, Zhong Y, Goetzinger KR, Odibo L, Bick JL, Bower CR, Nelson DM. First -trimester placental protein 13, PAPP-A, uterine artery Doppler and maternal characteristics in the prediction of pre-eclampsia. *Placenta*. 2011 ;32(8):598-602.
108. Wortelboer EJ, Koster MP, Cuckle HS, Stoutenbeek PH, Schielen PC, Visser GH. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset pre-eclampsia *BJOG*. 2010 ;117:1384-9.
109. Sekizawa A, Purwosunu Y, Yoshimura S, Nakamura M, Shimizu M,

- Okai T, Rizzo N, Farina A. Pp13 mrna expression in trophoblasts from preeclamptic placentas. *Reprod Sci* 2009, 16:408–413.
110. [Akolekar R](#), [Zaragoza E](#), [Poon LC](#), [Pepes S](#), [Nicolaidis KH](#). Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 ;32:732-9.
111. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, Hankins G, Berkowitz RL, Merkatz I, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Vidaver J, D'Alton ME. [First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study \(the FASTER Trial\)](#). *Am J Obstet Gynecol.* 2004 ;191:1446-51
112. [Akolekar R](#), [Syngelaki A](#), [Beta J](#), [Kocylowski R](#), [Nicolaidis KH](#). Maternal serum placental protein 13 at 11-13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat Diagn.* 2009 ;29:1103-8
113. Pilalis A, Souka AP, Antsaklis P, Daskalakis G, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. [Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler and PAPP-A at 11-14 weeks' gestation](#). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 ;29:135-40
114. Poon LC, Maiz N, Valencia C, Plasencia W, Nicolaidis KH. [First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia](#). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Jan;33(1):23-33
115. Spencer K, Cowans NJ, Nicolaidis KH. [Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia](#). *Prenat Diagn.* 2008 ;28:7-10
116. Driul L, Londero A. P, Bertozzi S, Fruscalzo A, Salvador S, Biasioli A,

- Fachechi G, Ceraudo M, Marchesoni D. Die Rolle des mütterlichen Serum PAPP-A in der frühen Schwangerschaft und andere Risikofaktoren für Präeklampsie bei einzigartigen Schwangerschaften (abstract), in 'Abstractband 14. Deutscher Gestose Kongress (Bamberg) 2011
117. Kuc s, Wortelboer EJ, van Rijn BB, Franx A, Visser GHA, Schielen PCJ. Evaluation of 7 Serum biomarkers and uterine artery doppler ultrasound for first trimester prediction of preeclampsia: a sistematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2011 ;66:225-39
118. [Verlohren S](#), [Herraiz I](#), [Lapaire O](#), [Schlembach D](#), [Moertl M](#), [Zeisler H](#), [Calda P](#), [Holzgreve W](#), [Galindo A](#), [Engels T](#), [Denk B](#), [Stepan H](#) The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 in press. Doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.037
119. Vaisbuch E, Whitty JE, Hassan SS, Romero R, Kusanovic JP, Cotton DB, Sorokin Y, Karumanchi SA. Circulating angiogenic and antiangiogenic factors in women with eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Feb;204(2):152.e1-9.
120. [Erez O](#), [Romero R](#), [Espinoza J](#), [Fu W](#), [Todem D](#), [Kusanovic JP](#), [Gotsch E](#), [Edwin S](#), [Nien JK](#), [Chaiworapongsa T](#), [Mittal P](#), [Mazaki-Tovi S](#), [Than NG](#), [Gomez R](#), [Hassan SS](#) The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008 ;21:279-87.
121. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA [First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia.](#) *J Clin Endocrinol Metab.*

- 2004 Feb;89(2):770-5.
122. Vatten LJ, Eskild A, Nilsen TI, Jeansson S, Jenum PA, Staff AC. [Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia.](#) Am J Obstet Gynecol. 2007 Mar;196(3):239.e1-6.
123. Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, Thadhani R. [Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia.](#) Hypertension. 2007 Jul;50(1):137-42. Epub 2007 May 21
124. Audibert F, Boucoiran I, An N, Aleksandrov N, Delvin E, Bujold E, Rey E. [Screening for preeclampsia using first-trimester serum markers and uterine artery Doppler in nulliparous women.](#) Am J Obstet Gynecol. 2010 Oct;203(4):383.e1-8.
125. [Verlohren S](#), [Stepan H](#), [Dechend R](#) Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia Clin Sci (Lond). 2012 Jan;122(2):43-52
126. Foidart JM, Munaut C, Chantraine F, Akolekar R, Nicolaides KH. Maternal plasma soluble endoglin at 11-13 weeks' gestation in pre-eclampsia. Ultrasound Obstet Gynecol. 2010 Jun;35(6):680-7.
127. Mari G, Picconi J. Doppler vascular changes in intrauterine growth restriction. Semin Perinatol. 2008 ;32:182-9.
128. Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, Wolf H, Berg C, Rigano S, Germer U, Moyano D, Turan S, Hartung J, Bhide A, Müller T, Bower S, Nicolaides KH, Thilaganathan B, Gembruch U, Ferrazzi E, Hecher K, Galan HL, Harman CR. Predictors of neonatal outcome in early-onset placental dysfunction. Obstet Gynecol. 2007 ;109:253-61.

129. Audibert F, Boucoiran I, An N, Aleksandrov N, Delvin E, Bujold E, Rey E. [Screening for preeclampsia using first-trimester serum markers and uterine artery Doppler in nulliparous women.](#) Am J Obstet Gynecol. 2010 ; 203:383.e1-8.
130. Dane B, Dane C, Kiray M, Koldas M, Cetin A. A new metabolic scoring system for analyzing the risk of hypertensive disorders of pregnancy. Arch Gynecol Obstet 2009; 280: 921-924.
131. Mazar RM, Srinivas SK, Sammel MD, Andrela CM, Elovitz MA. Metabolic score as a novel approach to assessing preeclampsia risk. Am J Obstet Gynecol 2007; 197: 411.e1-e5.
132. Bodanr LM, Catov JM, Jlebanoff MA, Ness RB, Roberts JM. Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy. Epidemiology 2007;18: 234-239.
133. LU Jie, ZHAO Yang-yu, QIAO Jie, ZHANG Hong-jun, GE Lin , WEI Yuan A follow-up study of women with a history of severe preeclampsia: relationship between metabolic syndrome and preeclampsia. [Chinese Medical Journal, 2011, 124 No. 5 775-779](#)
134. Smith GN, Walker MC, Liu A, Wen SW, Swansburg M, Ramshaw H, et al. A history of preeclampsia identifies women who have underlying cardiovascular risk factors. Am J Obstet Gynecol 2009; 200: 58.e1-e8.
135. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta 2009; 30 Suppl A: S32-S37
136. Ong CY, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH [First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications.](#) BJOG.

- 2000 ;107:1265-70.
137. Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Meiri H. [First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia.](#) Ultrasound Obstet Gynecol. 2007 ;29:128-34.
138. [Smith GC](#), [Stenhouse EJ](#), [Crossley JA](#), [Aitken DA](#), [Cameron AD](#), [Connor JM](#) Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. J Clin Endocrinol Metab. 2002 ;87:1762-7.
139. [Vandenbergh G](#), [Mensink I](#), [Twisk JW](#), [Blankenstein MA](#), [Heijboer AC](#), [van Vugt JM](#). First trimester screening for intra-uterine growth restriction and early-onset pre-eclampsia. Prenat Diagn. 2011 ;31:955-61.
140. [Spencer K](#), [Cowans NJ](#), [Avgidou K](#), [Molina F](#), [Nicolaidis KH](#). First-trimester biochemical markers of aneuploidy and the prediction of small-for-gestational age fetuses. Ultrasound Obstet Gynecol. 2008 ;31:15-9.
141. Tamimi R, Laggiou P, Vatten LJ, Mucci L, Trichopoulos D, Hellerstein S, Ekblom A, Adami HO, Hsieh CC. [Pregnancy hormones, pre-eclampsia, and implications for breast cancer risk in the offspring.](#) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12:647-50
142. King AE, Critchley HO [Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium.](#)J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 31;120:116-26.
143. [Liu J](#), [Matsuo H](#), [Laoag-Fernandez JB](#), [Xu Q](#), [Maruo T](#). The effects of progesterone on apoptosis in the human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. Mol Hum Reprod. 2007 ;13:869-74.
144. Tilg H, Moschen AR [Adipocytokines: mediators linking adipose tissue.](#)

- [inflammation and immunity](#). Nat Rev Immunol. 2006 ;6:772-83
145. Zavalza-Gómez AB, Anaya-Prado R, Rincón-Sánchez AR, Mora-Martínez JM. [Adipokines and insulin resistance during pregnancy](#). Diabetes Res Clin Pract. 2008 80:8-15.
146. [Yang Q](#), [Graham TE](#), [Mody N](#), [Preitner F](#), [Peroni OD](#), [Zabolotny JM](#), [Kotani K](#), [Quadro L](#), [Kahn BB](#). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature. 2005 ;21;436:356-62.
147. Yao-Borengasser A, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Lee MJ, Starks T, Kern LM, Spencer HJ 3rd, Rashidi AA, McGehee RE Jr, Fried SK, Kern PA. [Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone](#). J Clin Endocrinol Metab. 2007 92:2590-7.
148. Chan TF, Chen HS, Chen YC, Lee CH, Chou FH, Chen IJ, Chen SY, Jong SB, Tsai EM Increased serum retinol-binding protein 4 concentrations in women with gestational diabetes mellitus. Reprod Sci. 2007;14:169-74.
149. Kim SH, Choi HJ, Im JA. Retinol-binding protein 4 responses during an oral glucose tolerance testing in women with gestational diabetes mellitus. Clin Chim Acta. 2008;391:123-5.
150. Krzyzanowska K, Zemaný L, Krugluger W, Schernthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, et al. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. Diabetologia. 2008;51:1115-22..
151. Lewandowski KC, Stojanovic N, Bienkiewicz M, Tan BK, Prelevic GM, Press M, et al. Elevated concentrations of retinol-binding protein-4 (RBP-4) in

gestational diabetes mellitus: negative correlation with soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1). *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(6):300-5.