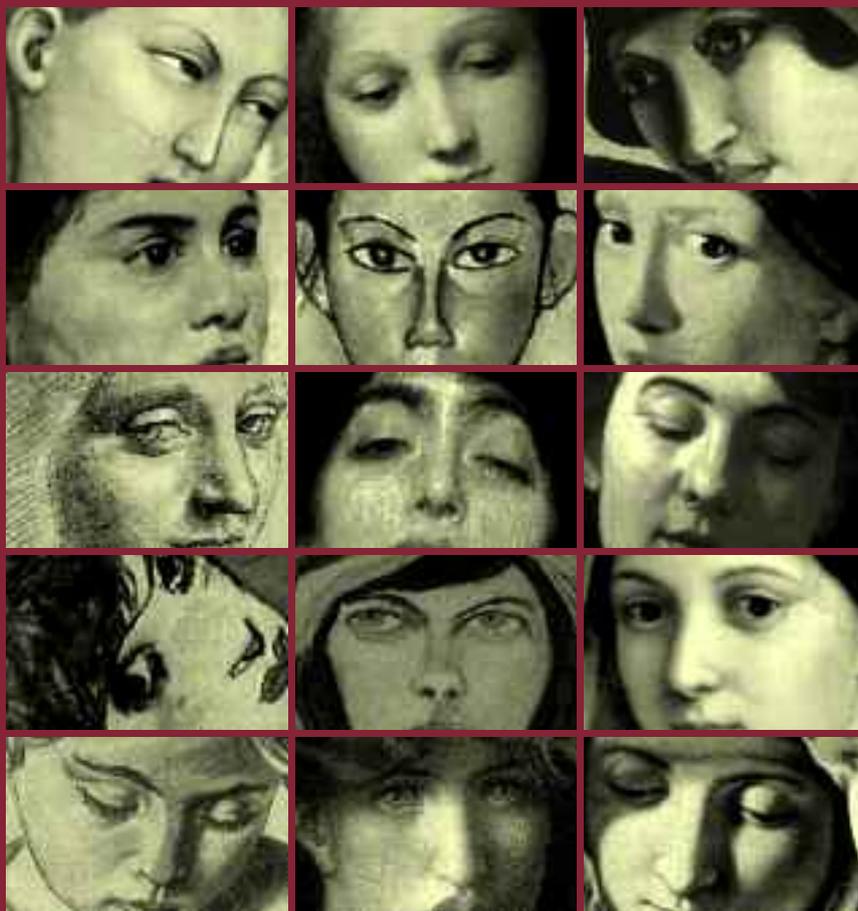


RIVISTA DI OSTETRICIA GINECOLOGIA PRATICA E MEDICINA PERINATALE



ORGANO UFFICIALE DELL'ASSOCIAZIONE OSTETRICI
GINECOLOGI OSPEDALIERI ITALIANI E DELL'EUROPEAN
SOCIETY OF BREAST ECHOGRAPHY

**RIVISTA DI OSTETRICIA
GINECOLOGIA PRATICA
E MEDICINA PERINATALE**

Organo Ufficiale dell'Associazione Ostetrici
Ginecologi Ospedalieri Italiani e dell'European
Society of Breast Echography

Trimestrale - Vol. XXIV n°2 2009

Direttore Scientifico

Felice Repetti

Comitato Scientifico

Giovanni Brigato
Antonio Chiàntera
Carlo Sbiroli

Direttore Responsabile

Eva Antoniotti

Coordinamento redazionale

Arianna Alberti

Pubblicità

Publiem Srl
Centro Direzionale Colleoni
Palazzo Perseo 10
20041 Agrate (Milano)
Tel. 039.6899791 - Fax 039.6899792

Editore



Health Communication srl
Edizioni e servizi di interesse sanitario

Via Vittore Carpaccio, 18 - 00147 Roma
Tel. 06.594461 Fax 06.59446228
redazione@hcom.it

Progetto grafico

Silvia de Toma

Stampa

Artigrafiche srl
Pomezia (Rm)

Sped. in abb. postale - D.L. 353/2003
(conv. in L. 27/02/2004 n. 46)
Art. 1, comma 1, DCB Roma
Reg. Trib. di Milano del 30.07.1986 n. 425

Finito di stampare: settembre 2009

Tiratura 6.500 copie

Indice

2

Risonanza magnetica nello studio fisiopatologico
del pavimento pelvico

*R. Zarbo, S.R.M. Abruzzo, T.G. Tomaselli, A. Garufi, G.D. Priolo,
M.L. Mandala', P. Scollo*

8

Tecnologie biomolecolari nella diagnosi delle neoplasie
ginecologiche: dalla PCR alla real time

A. Tinelli, G. Leo, C. Petrelli, S. Malerba, G. Capone, F. Storelli, M. Pisanò

15

Screening ecografico nel I trimestre: nostra esperienza

R.M. Di Lauro, C. Matarazzo, M. Foppoli, E. V. Scotti, Benedetto De Pasquale

20

Trattamento scleroembolizzante del varicocele pelvico femminile
e della sindrome da congestione pelvica

*A. Tinelli, R. Prudeniano, M. Torsello, F. Nicolaci, C. A. De Marzi, F. Totaro Aprile,
A. Malvasi, F. G. Tinelli*

In copertina, particolari delle seguenti opere:

Giovanni da Milano
Natività, 1365
Giovanni Fattori
Ritratto della figliastra, 1889
Leonardo da Vinci
Studio per una testa di donna, 1483
Egon Schiele
Wally in camicia rossa, 1913
Gino Severini
Bambina con coniglio, 1922

Raffaello Sanzio
Madonna del Granduca, 1506
Amedeo Modigliani
Ritratto di giovinetta, 1916
Gustav Klimt
Giuditta, 1918
Arnold Schonberg
Ritratto di Gertrud Schonberg, 1930
Daniele Gabriele Rossetti
Pandora, 1879

Tamara de Lempicka
Le due amiche, 1928
Johannes Vermeer
Ragazza con turbante, 1660
Felix Vallotton
Donna con cappello nero, 1908
Raffaello Sanzio
La Velata, 1514
Sassoferrato
Madonna 1670

Risonanza magnetica nello studio fisiopatologico del pavimento pelvico

Rosario Zarbo, Simona Rosa Maria Abruzzo, Tiziana Grazia Tomaselli, Antonio Garufi*, Maria Luisa Mandalà*, Paolo Scollo*

* U.O.C. Diagnostica per Immagini - A.O. "Cannizzaro" - Catania

**U.O.C. Ostetricia e Ginecologia - A.O. "Cannizzaro" - Catania

Riassunto

Obiettivo: Lo studio si propone di valutare le informazioni acquisite mediante imaging con Risonanza Magnetica del pavimento pelvico femminile sia statica che dinamica mediante differenti stimoli fisiologici e provocati.

Materiali e metodi: Sono state studiate 25 donne, di età compresa tra 28 e 62 anni, pluripare con patologia del pavimento pelvico. La RM è stata effettuata con magneti superconduttivi da 1,5 Tesla (Philips INTERA, Eindhoven NL) e le immagini sono state ottenute utilizzando la bobina per il corpo (Phased Array) a quattro canali. Sono state eseguite sequenze morfologiche, seguite dalla fase di studio dinamico basata sull'acquisizione d'immagini con sequenze veloci T2, Single Shot TurboSpin Echo fast 2D pesate in T2 (TR 1247 TE 325 - TSE factor 136 - FOV 375 - Flip angle 9 - NEX 1) eseguite sul piano sagittale in tre diverse fasi funzionali: durante il riposo, il ponzamento e la contrazione.

Risultati: Lo studio RM, utilizzando piani di riferimento tracciati sulle immagini T2 sagittali (linea pubococcigea e reperi mobili H ed M), ha evidenziato 5 casi di ipermobilità uretrale, 12 casi di cistocele 4 casi di patologia del compartimento medio (2 isterocele e 2 prolasso di cupola), 2 di rettocele di grado moderato, 1 caso di enterocele ed infine 1 caso di grave ernia perineale.

Conclusioni: Le sequenze dinamiche RM permettono una innovativa visualizzazione del

INTRODUZIONE

Le disfunzioni del pavimento pelvico includono un eterogeneo gruppo di condizioni patologiche molto frequenti e prevalenti nelle donne pluripare ed in peri e postmenopausa, anche se non ne sono affatto esenti le donne più giovani. Tali disfunzioni sono particolarmente correlate al danno neuromuscolare dello elevatore dell'ano (che rappresenta il maggiore supporto statico e dinamico degli organi pelvici) ed alla lesione acuta e/o cronica dei supporti fasciali e ligamentosi dei visceri.

Il fattore etiopatogenetico più importante è il parto; altri importanti fattori di rischio sono la menopausa, l'obesità, le malattie respiratorie croniche ostruttive e tutte le altre condizioni acute o croniche che determinano aumento della pressione addominale.

Le alterazioni della statica pelvica possono esprimersi come prolasso genitale, incontinenza o ritenzione urinaria o fecale, dolore pelvico cronico e disfunzioni sessuali (prevalentemente dispareunia).

Data l'incompleta comprensione della fisiopatologia e non indifferente tasso di recidiva, le tecniche d' imaging possono dare un notevole ausilio nella valutazione e obiettivazione dei casi clinici, specialmente quelli più complessi con deficit multicompartimentali, influenzando le scelte terapeutiche e fornendo metodi obiettivi di valutazione dei risultati.

I metodi d'imaging più adottati sono quelli forniti dalla radiologia tradizionale (uretrocistografia minzionale e a catenella, defecografia e la uretrocistocolpodefecografia o perineografia sec. Betoux) e dall'endoscopia (uretrocistoscopia e anoretoscopia).

Metodiche più recentemente adottate in questo ambito sono l'ecografia e la risonanza magnetica (RM) pelviperineale.

La RM, tecnica diagnostica basata sull'uso di campi elettromagnetici, consente un imaging multiplanare (immagini secondo piani sagittali, coronali, assiali e obliqui), multiparametrico e con elevata risoluzione di contrasto. La possibilità di ottenere acquisizioni sui tre assi corporei principali garantisce una completa ed anatomicamente precisa raffigurazione dei compartimenti pelvici anteriore, centrale e posteriore.

Il recente sviluppo di sequenze rapide (fast imaging) permette di valutare, in un unico esame e in tempi brevi, l'intera pelvi, sia dal punto di vista morfologico che dinamico (2). L'accettabilità è elevata, a meno che la paziente non sia claustrofobica; non si utilizzano mezzi di contrasto, non espone a radiazioni ionizzanti ed, infine, ha tempi di esecuzione relativamente brevi.

La RM ha delle controindicazioni assolute (pazienti portatrici di pace-maker e di protesi vascolari metalliche ferromagnetiche) ed è metodica ad alto costo, quindi non sempre disponibile nel territorio.

pavimento pelvico, e quindi aggiunge importanti dati nella valutazione delle diverse interazioni delle strutture e del grado di prolusso.

Parole chiave

Risonanza Magnetica
Sequenze dinamiche
Pavimento pelvico
Prolusso

Summary

Magnetic Resonance in the static and dynamic study of pelvic floor

Purpose: the purpose of this study is to evaluate the information acquired by imaging through magnetic resonance (MR) of the female pelvic floor – static and dynamic – under different physiological and induced stimuli.

Materials and methods: 25 multiparous women aged between 28 and 62 with pelvic floor disease have been examined. MR was carried out with a super-conductive magnet of 1,5 Tesla (Philips INTERA, Eindhoven NL) and the images were obtained with a 4 channel bobbin for the body (Phased Array). The morphological sequences were followed by a dynamic phase based on quick sequence images T2 Single Shot TurboSpin Echofast 2D in T2 (TR 1247 TE 325 - TSEfactor 136 – FOV 375 - Flip angle 9 - NEX 1) upon a sagittal surface in three different conditions: at rest, under stress and contracted.

Results: MR using two reference surfaces on T2 sagittal images (H ed M) has evidenced 5 cases of metrial hypermobility, 12 cases of cistocele, 4 cases of median compartment's pathology (histerocele and prolapse of the vaginal cupola), 2 of moderate rectocele, 1 case of enterocele and 1 severe case of perineal hernia.

Conclusions: Dynamic MR sequences offer an innovative presentation of the pelvic floor and thus adds important data regarding structural interactions and prolapse grades.

Keywords

Magnetic Resonance
Dinamic Sequences
Female Pelvic Floor
Prolapse

Altro aspetto, relativamente, negativo è determinato dal fatto che l'esame viene condotto in posizione clinostatica per cui un eventuale "descensus" può venire sottostimato. Attualmente, studi condotti con magneti open, che consentono la posizione semiassisa della paziente, non determinano sostanziali vantaggi (1).

MATERIALI E METODI

Presso la sezione di Risonanza Magnetica dell'U.O. di Diagnostica per Immagini dell'Az. Ospedaliera "Cannizzaro" di Catania sono state studiate 25 donne, di età compresa tra 28 e 62 anni, pluripare con patologia del pavimento pelvico. Di queste, 10 erano già state sottoposte a cistografia minzionale, 3 a defecografia e 20 a studio urodinamico. Tutte erano state valutate clinicamente dal punto di vista uro-ginecologico.

La RM è stata effettuata con magneti superconduttivi da 1,5 Tesla (Philips INTERA, Eindhoven NL) e le immagini sono state ottenute utilizzando la bobina per il corpo (Phased Array) a quattro canali.

In tutte le pazienti, a digiuno da 12 ore, è stato eseguita distensione della vescica con acqua tramite catetere trans-uretrale ed in alcune pazienti si è provveduto all'introduzione di gel in canale rettale. In tre pazienti con sospetto isterocele è stato introdotto gel in vagina. Quindi le pazienti, con vescica repleta,

sono state posizionate sul lettino della RM, supine e con ginocchia semiflesse.

L'esame ha previsto sia una fase di studio morfologico, che una fase di studio dinamico.

La fase di studio morfologico è stata eseguita utilizzando tecnologia SENSE con sequenze T1 assiali (TR550 ms TE14 ms flip - Angle 90° - FOV 350 - Matrice 256 x256 - NEX 3) T2 sagittali TSE ed in soppressione del segnale del grasso (SPIR) ed assiali TSE (TR 3500 TE 90 – Flip Angle 90° - TSE factor18 matrice 256 x 256).

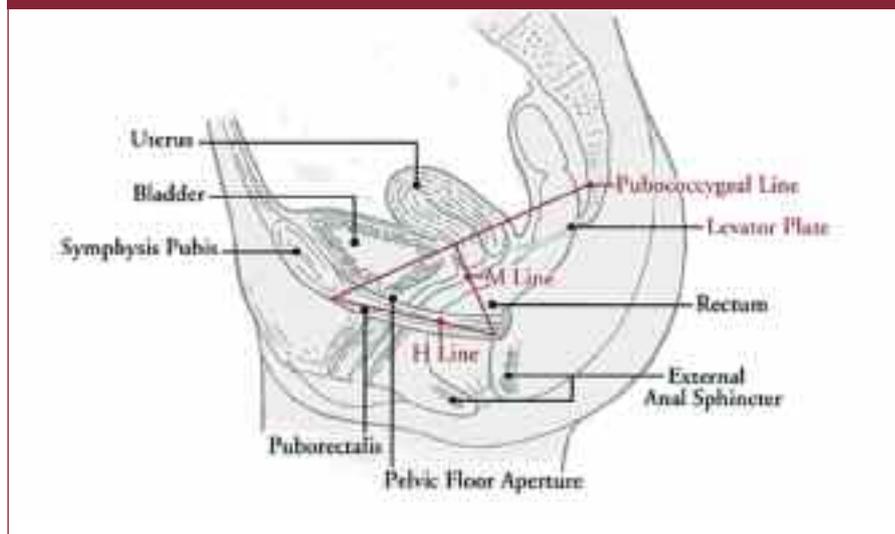
La fase di studio dinamico è basata sull'acquisizione d'immagini con sequenze veloci, registrate sul piano sagittale in tre diverse fasi funzionali: durante il riposo, il pompiamento e la contrazione, ottenendo in tal modo un'acquisizione cine-dinamica.

Sono state quindi eseguite sequenze Single Shot TurboSpin Echo fast 2D prevalentemente pesate in T2 (TR 1247 TE 325 - TSE factor 136 - FOV 375 - Flip angle 90 - NEX 1) 15 slice sui piani sagittali sia in fase di riposo che durante pompiamento. Ogni sequenza ha richiesto mediamente 20 secondi.

Per ogni paziente, sulle immagini sagittali, sono tracciati punti di repere che permettono di diagnosticare alla RM la presenza di eventuali prolapsi dei visceri pelvici (figg. 1-2).

Il primo punto di repere è la linea pubo-coccigea (PCL), tracciata dal margine inferiore

FIGURA 1. Rappresentazione schematica dei reperi anatomici e delle linee utilizzate (3)



della sinfisi pubica all'ultima articolazione del coccige, e rappresenta il livello del pavimento pelvico (1-5).

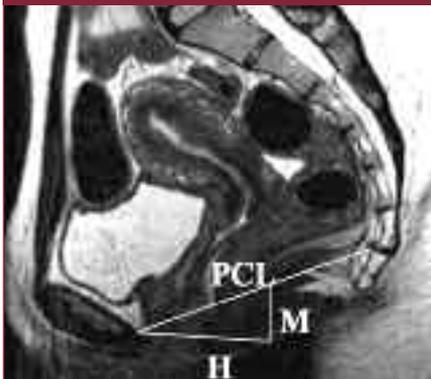
La distanza tra tale linea e il collo vescicale, la cervice e la giunzione ano-rettale vengono misurate sulle immagini ottenute a riposo e sotto sforzo e quantificano il grado di prolasso.

Il grado di prolasso è stato classificato, in base alla discesa del viscere al di sotto di tale linea, come lieve, se esteso per meno di 3 cm (gradi 1-2 della classificazione di Baden-Walker), moderato se tra i 3 e i 6 cm (grado 3 di Baden-Walker) e grave se oltre i 6 cm (gradi 3-4 della classificazione di Baden-Walker) (5). Altre misurazioni (reperi mobili) sono rappresentate dalla linea H e dalla linea M che aiutano nella conferma della lassità del pavimento pelvico.

La linea H definisce la larghezza antero-posteriore dello iato elevatore ed è tracciata dal margine inferiore della sinfisi pubica alla parete posteriore del retto a livello della giunzione ano-rettale. La linea M, tracciata perpendicolarmente alla PCL si congiunge al punto più posteriore della linea H e definisce la discesa del piano elevatore al di sotto della PCL (3).

Entrambi queste linee si allungano durante manovra di Valsalva se è presente una lassità del pavimento pelvico.

FIGURA 2. PCL: linea pubococcigea. H: distanza tra pube e canale anale posteriore. M: misura del descensus dell'elevatore dalla PCL



Si valuta quindi la larghezza dello iato elevatore, misurata nel punto di maggiore estensione nelle immagini in sezione assiale, a li-

FIGURA 3. RM coronale: elevatore dell'ano e l'angolo dell'elevatore dell'ano

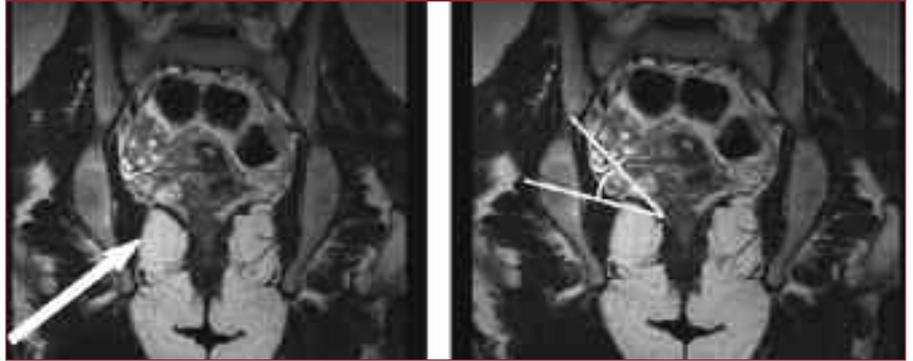


FIGURA 4. RM coronale: paziente incontinente con perineo discendente e perdita dell'angolo elevatore dell'ano



vello del collo vescicale e dell'uretra prossimale e la variazione dell'angolazione dell'asse uretrale all'aumentare della pressione addominale; tale parametro (valore normale inferiore a 115°) serve per la diagnosi della sindrome da ipermobilità uretrale.

Sulla base dei reperi RM, è stato definito il tipo (anteriore, centrale, posteriore), l'entità (lieve, moderato, grave) del prolasso e l'organo/i prolassato/i.

In genere la migliore valutazione delle strutture pelviche è ottenuta mediante immagini sagittali, mentre la visualizzazione del piatto dell'elevatore dell'ano e l'opportunità di apprezzarne l'integrità ed il posizionamento ed eventuale asimmetria del perineo discendente viene valutata secondo piani coronali (Figura 3).

Con le sequenze assiali si visualizza il normale aspetto a farfalla della vagina quando la "fionda" puboretale è integra. La porzio-

ne antero-esterna dello sfintere uretrale e il ligamento trasverso uretrale supportano la porzione anteriore dell'uretra e fanno parte dei meccanismi di continenza estrinseca (Figura 4).

RISULTATI

L'indagine RM è risultata, in tutti i casi, di qualità sufficiente a consentire la visualizzazione delle strutture anatomiche normali della pelvi e le variazioni fisiologiche indotte dalla manovra di ponzamento addominale.

La valutazione RM ha evidenziato:

1. ipermobilità uretrale: 5 casi
2. alterazioni isolate del compartimento anteriore: 12 casi di cistocele
3. alterazioni isolate del compartimento medio: 4 casi, di cui 2 di isterocele e 2 di prolasso di cupola
4. alterazioni isolate del compartimento posteriore: 3 casi, di cui 2 di rettocele di grado moderato e 1 caso di enterocele
5. alterazioni pluricompartimentali: 1 caso di grave ernia perineale.

Le dimensioni delle linee H ed M sono valutabili in cm. 6 e cm. 2 circa e sono aumentate in modo più netto durante ponzamento nel gruppo di donne con prolasso.

In tutti i casi la RM ha confermato i dati evidenziati dall'esame obiettivo pelvico; in particolare i dati di gravità clinica del prolasso, definiti sulla base della classificazione di Baden-Walker, sono risultati sovrapponibili alla gradazione RM della gravità del prolasso. In 7 casi la RM ha rivelato la presenza di alterazioni associate (isterocele ed enterocele) non diagnosticati all'esame obiettivo.

DISCUSSIONE

La RM si è, quindi, dimostrata metodica di grande rilevanza per lo studio e per la comprensione della complessa patologia disfunzionale della pelvi.

La multiplanarità e l'elevata risoluzione di contrasto permettono di visualizzare contemporaneamente le componenti viscerali e molte delle strutture muscolo-legamentose dei tre compartimenti pelvici, superando i limiti delle altre metodiche sopramenzionate.

L'evoluzione tecnologica ha consentito l'uso di sequenze veloci ideali per eseguire studi dinamici durante la manovra di Valsalva e in fase minzionale o defecatoria, in grado di riprodurre le situazioni fisiologiche responsabili della comparsa dei sintomi (2).

La RM dinamica si è dimostrata metodica di imaging di scelta per la valutazione e la stadiazione della disfunzione del pavimento pelvico e per la pianificazione preoperatoria in pazienti che sono stati sottoposti a precedenti interventi sul pavimento pelvico.

Il nostro studio è stato focalizzato soprattutto alla patologia del compartimento pelvico anteriore, ove la RM ha permesso di studiare in particolare l'iper mobilità uretrale ed il cistocele.

L'iper mobilità uretrale è caratterizzata da un'eccessiva variazione dell'asse uretrale con l'incremento della pressione addominale: a riposo l'uretra è in posizione normale, ma sotto sforzo si disloca inferiormente. Ciò è dovuto principalmente ad una lesione dei supporti anatomici che stabilizzano l'uretra prossimale determinando una discesa rotazionale dell'uretra, del collo vescicale e della base della vescica nello spazio retropubico. Ne consegue che la pressione vescicale supera quella uretrale con conseguente possibile fuoriuscita involontaria di urina (5).

In 5 pazienti l'uretra, in posizione regolare a riposo, sotto stress si dislocava inferiormente con conseguente modificazione dell'angolo vescico-uretrale i cui valori risultavano superiori a 115° , riferiti come valori soglia (Figura 5).

Il cistocele (Figure 6 a,b) è ben documentabile in RM grazie alle immagini dinamiche eseguite a riposo e sotto stress sulla base dell'iperintensità di segnale dell'urina.

FIGURA 5. RM dinamica T2: Cistocele di grado moderato (inclinazione dell'asse uretrale $>$ a 115°)



FIGURA 6A. RM sagittale dinamica: cistocele di II grado

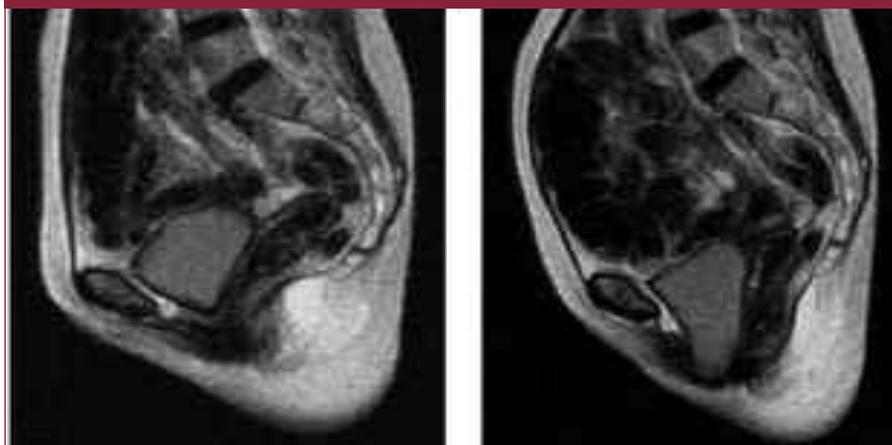
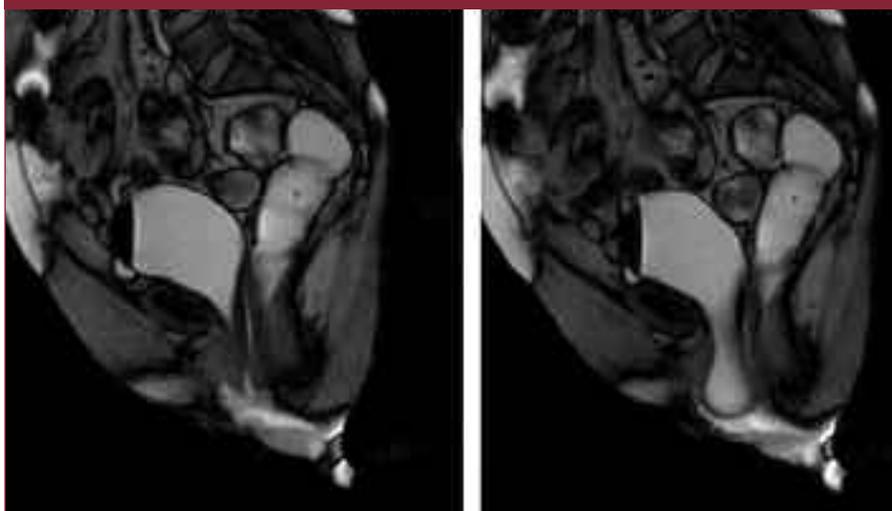


FIGURA 6B. RM sagittale dinamica: cistocele di III grado



Nei casi più gravi la parete posteriore della vescica si sposta in basso e posteriormente sino a protrudere dall'ostio vaginale mentre, in condizioni normali, rimane al di sopra della linea pubo-coccigea.

Per quanto riguarda il compartimento medio, la RM nelle immagini sagittali bene evidenzia come normalmente la porzione prossimale della vagina risulti orientata posteriormente con asse orizzontale (4).

Nelle pazienti con prolasso, la vagina perde questo normale orientamento, dislocandosi inferiormente con verticalizzazione del suo asse (Figura 7).

Poiché le strutture pelviche sono rese solidali dalle strutture muscolari e ligamentose, l'isterocele si associa alla discesa di altri organi; infatti l'indebolimento del sistema di sospensione e/o di sostegno provoca quasi sempre modificazioni anche nella posizione delle altre strutture.

Il rettocele è una protrusione anteriore del contorno del retto per più di 2-3 cm al davanti di una linea tangente alla parete del canale anale (Figura 8).

Questa alterazione del compartimento posteriore è ben documentabile con la RM dinamica anche in corso di defeco-RM.

Più che per l'evidenza degli organi prolapsati, apprezzabili anche con le altre metodiche descritte in precedenza, la RM si è dimostrata metodica utile per la possibilità di visualizzare, in modo panoramico, anche le strutture muscolo-legamentose, con il vantaggio dello studio morfologico dei prolassi e delle alterazioni disfunzionali del pavimento pelvico (3).

L'analisi combinata delle immagini RM statiche e dinamiche di pazienti con patologia del pavimento pelvico ha permesso l'identificazione delle anomalie morfologiche con le specifiche disfunzioni.

Un limite non indifferente della RM è costituito dalla incompleta riproducibilità di alcune situazioni fisiologiche (ortostatismo, fasi minzionale e/o defecatoria), che sono, a volte, le sole in grado di rendere evidente un deficit funzionale altrimenti non individuabile.

Già da diversi anni, però, è stata proposta la RM a paziente seduto all'interno del gantry con magneti aperti a basso e medio campo (0.5 Tesla) (1).

Recentemente, l'avvento di magneti aperti ad

FIGURA 7. Prolasso vaginale; aumento dell'angolo dell'asse vaginale sotto ponzamento (P. isterectomizzata)

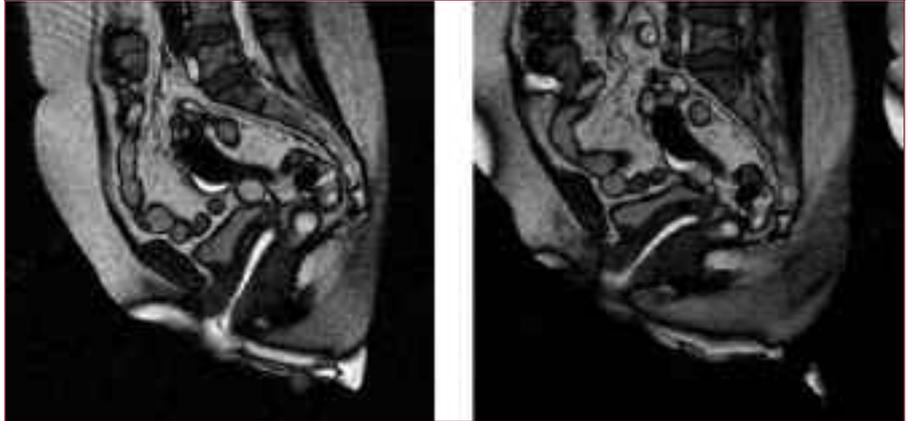


FIGURA 8. RM dinamica sagittale: rettocele

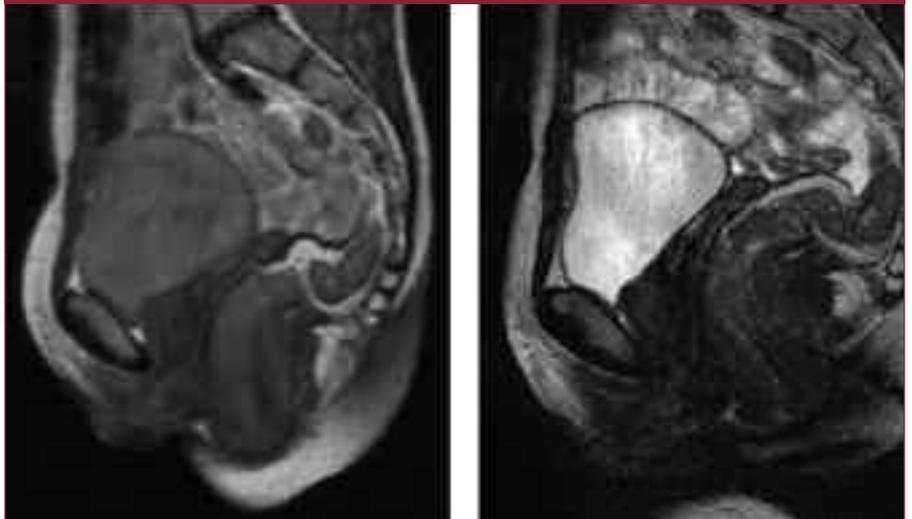
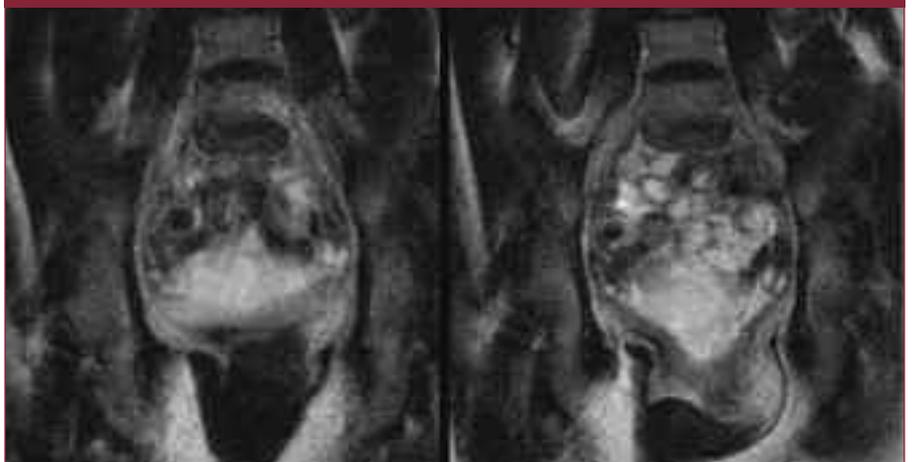


FIGURA 9. RM dinamica coronale: protrusione e prolasso vescica e anse intestinali accentuati dopo ponzamento (ernia perineale). Assottigliamento e bulging del m.elevatore dell'ano



alto campo (1.5Testa) ha sicuramente migliorato la qualità delle immagini specie per il miglioramento della risoluzione spaziale oltre che, ovviamente, della risoluzione di contrasto.

CONCLUSIONI

La nostra esperienza, con casistica varia, ma limitata, pur evidenziando bene le patologie riscontrate e esplicitando le notevoli potenzialità della metodica, in particolare nelle immagini dinamiche, non permette di avanzare proposte conclusive in quanto necessita di un ampliamento delle osservazioni al fine di ottenere delle valutazioni statistiche affidabili; pertanto è da considerare work in progress.

Ci siamo programmati, infatti, di ampliare lo studio al fine soprattutto di validare il ruolo della metodica RM nella valutazione pre e postchirurgica e nel follow-up della patologia del pavimento pelvico.

BIBLIOGRAFIA

1. Bertschinger KM, MD, Hetzer FH, MD, Roos JE, MD, Treiber K, RT, Marincek B, MD and Hilfiker PR. MD: Dynamic MR Imaging of the Pelvic Floor Performed with Patient Sitting in an Open-Magnet Unit versus with Patient Supine in a Closed-Magnet Unit.. Radiology 2002;223:501
2. El Sayed, Rania RF, MD, Sahar El Mashed, MD, Farag A, MD, Medhat M Morsy, MD, and

Mohamed S Abdel Azim, MD Pelvic Floor Dysfunction. Assessment with Combined Analysis of Static and Dynamic MR Imaging Findings. Radiology 2008;248:518-530

3. Fielding JR. Practical MR Imaging of Female Pelvic Floor Weakness. Radiographics 2002;22:295-304

4. Pannu HK, Kaufman HS, Cundiff GW et al. Dynamic MR Imaging of Pelvic Organ Prolapse: Spectrum of Abnormalities. Radiographics 2000;20:1567-1582

5. Torricelli P e Coll. La Risonanza Magnetica nella valutazione dei disordini funzionali del pavimento pelvico femminile. Edizioni Minerva Medica Torino. Radiol Med 2002;103:488-500

Tecnologie biomolecolari nella diagnosi delle neoplasie ginecologiche: dalla PCR alla real time

Andrea Tinelli, Maurizio Pisanò, Sara Leo, Valeria Mezzolla, Stefania Malerba, Claudia Petrelli, Marilena Galante, Fabio Storelli, Giuseppe Leo

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

° Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LB MOS), Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

Riassunto

Una neoplasia è caratterizzata da una incontrollata riproduzione cellulare, per una cessazione di risposta ai meccanismi di controllo di proliferazione, in seguito a danni a carico del patrimonio genetico cellulare. Lo studio di tali passaggi prevede l'utilizzo corrente di tecniche di biologia molecolare, attualmente imprescindibile in ogni determinazione clinico-scientifica.

La moderna biologia molecolare si avvale di sistemi di clonazione e di studio genomico degli acidi nucleici messi a punto agli inizi degli anni 80 e via via sviluppati sino ai giorni nostri, sulla scorta di geniali intuizioni e ripetuti tentativi in laboratorio. In questo articolo parleremo della nascita della PCR (Polimerase Chain Reaction), del suo continuo sviluppo sino alla messa a punto della metodica automatizzata della Real Time, delle varie indagini molecolari sul DNA e sull'mRNA, mediante il recupero da frammenti congelati o paraffinati o da sangue o campioni tissutali.

Parole chiave

Oncologia ginecologica
DNA
mRNA
Biologia molecolare
Real Time
Paraffina

INTRODUZIONE

Il termine "oncologia" deriva dal greco óncos = massa e logos = studio ed è quella branca della medicina che si occupa dello studio delle neoplasie. L'oncologia si divide a sua volta in due discipline che hanno caratteristiche diverse ma sono tra loro complementari. L'oncologia sperimentale che individua tutte quelle specialità che studiano i meccanismi molecolari alla base delle neoplasie, e l'oncologia clinica che individua tutte quelle specialità mediche che si occupano della diagnosi e del trattamento terapeutico dei tumori.

Dal punto di vista biologico, un tumore maligno è caratterizzato da una incontrollata riproduzione cellulare, a sua volta determinata da una cessazione di risposta ai meccanismi di controllo di proliferazione, per danni a carico del patrimonio genetico cellulare.

I tumori, nonostante il meccanismo biologico di sviluppo sia unico, possono manifestarsi in molteplici modi; costante è però l'aumento del numero di cellule cancerose, dovuto alla maggiore velocità di riproduzione cellulare, motivo per cui un maggior numero di cellule tumorali si moltiplica ed un minor numero di esse muore, mentre quelle che sopravvivono continuano a moltiplicarsi. La crescita tumorale segue una impostazione geometrica: è molto lenta all'inizio, ma accelera all'aumentare della massa del tumore. La dimensione critica di un tumore è di circa 1

centimetro cubico, raggiunta tale dimensione il tumore inizia a crescere molto velocemente e a dare luogo ai primi sintomi, e diventa diagnosticabile mediante visite mediche ed analisi biochimiche e strumentali. All'anatomia patologica spetta il compito di confermare la natura, il grado di malignità (o grading) e l'estensione (o staging) del tumore, in particolare attraverso l'esame istologico dei tessuti che ormai viene integrato da tecniche molecolari di indagine genomica che scandagliano gli acidi nucleici (DNA ed RNA) e/o si concentrano sullo studio proteomico dell'espressione proteica.

In questo articolo, spiegheremo meglio quali sono le indagini strumentali molecolari più utilizzate in ambito genomico per lo studio delle neoplasie ginecologiche (1-3).

LA SCOPERTA DELLA PCR NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Nel 1983 Kary Banks Mullis, un biochimico statunitense, risolveva il problema principale della genetica del tempo, cioè quello delle troppo esigue quantità di DNA di cui gli operatori disponevano per effettuare i loro studi sul genoma. I metodi allora esistenti, per aumentare la quantità di DNA, infatti erano lunghi, molto complessi, imprecisi e costosi.

Lo scienziato ispirandosi ai meccanismi di replicazione del DNA, che avvengono nella cellula, per la prima volta parlò di PCR (Polime-

Summary

Biomolecular Technologies in Gynecological Tumor Diagnosis: from PCR to Real Time

A tumor is characterized by an uncontrolled cellular reproduction, for a stop in the proliferating control mechanisms, for a DNA damaging in the genomic heritage. The study of such passages foresees the utilization of techniques of molecular biology, currently strictly linked to each scientific and clinical evaluation.

The modern molecular biology avails of cloning systems and of genomic study of nucleic acids, adjusted since the beginning of 80', and successively developed till to our days, basing on genial intuitions and repeating laboratory attempts. In this article, we discuss on the newborn of PCR (Polimerase Chain Reaction), on its developing till to the current automatic method called Real Time, of the various molecular exams on DNA and mRNA, by their recovering in frozen sections or in paraffined tissues or in bloody samples or in tissue collections.

Keywords

Gynecologic oncology

DNA

mRNA

Molecular biology

Real Time

Paraffine

rase Chain Reaction) e, in una delle più antiche e prestigiose riviste americane di divulgazione scientifica, Scientific American, pubblicò un articolo in cui scriveva: "Iniziando da una singola molecola di DNA, la PCR è in grado di generare 100 bilioni di molecole simili, in un solo pomeriggio. La reazione è semplice da eseguire. Essa richiede solo una provetta, alcuni semplici reagenti e una fonte di calore. Il DNA che si desidera copiare può essere puro, oppure può essere una piccola parte di una miscela estremamente complessa di materiale biologico. Il DNA può provenire da un campione tissutale ospedaliero, può essere prelevato da un singolo capello, da una goccia di sangue essiccato rilevato sulla scena del crimine, può provenire da tessuti cerebrali imbalsamati o da fossili di resti di mammoth congelati nei ghiacciai e risalenti a 40.000 anni fa".

Con queste brevi righe lo scienziato metteva quindi in risalto, non solo l'estrema semplicità della tecnica, ma anche la sua enorme versatilità e molteplicità di impiego. (4)

Il 13 ottobre 1993 la Royal Swedish Academy of Science assegnò il premio Nobel per la Chimica al Dr. Mullis, per la sua invenzione sulla PCR e al Professor Michael Smith per la messa a punto di tecniche di mutagenesi sito specifiche.

È da tale momento che la biologia molecolare ricevette un forte sviluppo, tale da cambiare radicalmente l'approccio allo studio degli acidi nucleici, conclusosi poi con il progetto Genoma Umano (con una non prevista grande accelerazione sui tempi di attuazione).

La possibilità di disporre di quantità virtualmente illimitate di un determinato frammento di DNA, anche nel caso di materiale di partenza estremamente esiguo o danneggiato da processi di degradazione, ha di fatto reso questo procedimento come una delle scoperte più importanti di tutti i tempi nel campo della biologia molecolare.

Dal punto di vista tecnico, la PCR è un processo in vitro che permette, attraverso l'utilizzo di una DNA Polimerasi, l'amplificazione di un target a DNA o anche ad RNA, previa retrotrascrizione in cDNA, utilizzando l'enzima Retrotrascrittasi (RT-PCR). (5-7)

Nelle prime tecniche di amplificazione veniva usata la DNA Polimerasi I di E. Coli, un

enzima di 109 kDa privato però, dei primi 323 amminoacidi posti all'N-terminale. Con un enzima dotato di tale attività infatti, si andava incontro al rischio della degradazione dei primers, quindi è stato preferito andare a modificare tale proteina rimuovendo questa parte cataliticamente scomoda.

Per tale motivo, si è assegnato a questa Polimerasi, il nome di Frammento di Klenow, rappresentando essa, solo una parte (un frammento appunto) dell'intero enzima. Tuttavia un limite importante di questa Polimerasi modificata era la sua termolabilità alle alte temperature raggiunte durante le fasi di denaturazione, che costringeva l'operatore a doverla aggiungere a ogni ciclo e che impediva all'intero metodo di essere duttile (8).

La soluzione a tale problema si ebbe più tardi, con la scoperta, nelle calde acque delle sorgenti geotermiche del Parco Nazionale di Yellowstone (uno dei più grandi ecosistemi intatti della zona temperata presenti sulla Terra, negli USA) di una forma di vita estremofila, un batterio, il *Thermophilus aquaticus*. (4,9).

Nel 1969 due ricercatori, Thomas Brock e Hudson Freeze, che lavoravano per l'Università dell'Indiana, riportarono in letteratura, l'esistenza di questo batterio a cui si interessò in particolar modo Mullis che all'inizio degli anni '80 stava tentando di perfezionare il metodo della PCR.

In quel periodo, Mullis lavorava per la Cetus Corporation, in California, una delle più antiche e importanti compagnie bio-tecnologiche del Mondo; il dr. Mullis intuì che, utilizzando la DNA polimerasi del *Thermophilus aquaticus*, avrebbe potuto evitare di aggiungere a ogni ciclo l'enzima, in quanto, la Taq -nome che fu dato a questa polimerasi - era termostabile e manteneva la sua attività fino a una temperatura massima di 97,5°C per almeno 5-6 minuti. A temperature leggermente più basse, invece, la funzione enzimatica viene conservata per tempi maggiori e più precisamente a temperature di 92°C si osservava un dimezzamento dell'attività catalitica dopo ben 130 minuti, mentre a 95°C dopo 40 minuti. Inoltre l'efficienza dell'enzima, calcolata come numero di nucleotidi incorporati al secondo, aumentava proporzionalmente con la temperatura e mostrava un optimum a 72°C (con 150 nt/sec): a 55°C si aveva un

efficienza di 24nt/sec, mentre a 70°C di 60nt/sec. (4,10)

Con tali evidenze, Mullis realizzò la possibilità di automatizzare il processo di amplificazione del DNA, riuscendo a coniugare velocità e specificità, in quanto difficilmente le alte temperature consentono la formazione di appaiamenti aspecifici fra gli acidi nucleici. Questo permetteva ai primers di andare a legarsi a regioni specifiche del DNA, che quindi venivano duplicate esponenzialmente a ogni ciclo. (10,11)

L'UTILITÀ DALLA CLASSICA PCR E LIMITI DELLA TECNICA

Da quanto enunciato, appare evidente che la PCR resta una tecnica molecolare che permette di amplificare selettivamente, mediante una reazione a catena, sequenze di DNA o RNA di interesse clinico, che successivamente possono essere processate in modo diverso in base al tipo di scopo.

La possibilità di automatizzare tale processo mediante l'utilizzo della Taq, ha portato all'ideazione di una macchina programmabile, il termociclatore, grazie alla quale si possono impostare le diverse temperature del processo insieme ad altri parametri (tempo, ramp rate, ect...)(12).

Il processo di amplificazione si articola in tre fasi distinte che avvengono a temperature differenti:

- **Denaturazione (94-95°C):** durante questa fase si ha l'apertura della doppia elica di DNA, quindi il DNA passa da doppio a singolo filamento.
- **Annealing (40-68°C):** la temperatura della fase di annealing può variare e viene calcolata sulla base della temperatura di melting dei primers, che viene chiamata temperatura di dissociazione ed è indicata con "Td". La temperatura di dissociazione equivale alla temperatura alla quale i primers si trovano per il 50% della loro lunghezza, in forma denaturata. Il calcolo che viene eseguito per stabilire la temperatura di annealing, cioè la temperatura alla quale i primers andranno ad appaiarsi con il DNA stampo (o template).
- **Estensione (70-74°C):** a questo punto si attiva la Taq polimerasi che provvede ad allungare la sequenza di DNA a partire dall'estremità 3'-OH dei primers.

Grazie a questa cascata di eventi, tale tecnica appare dunque estremamente versatile e precisa, giacché, a partire anche da una singola molecola di DNA stampo, la PCR è in grado di aumentare esponenzialmente la quantità di acido nucleico. (4,9,12)

Partendo da una singola molecola di DNA doppio strand, alla fine del processo, dopo un numero predefinito di cicli (n° cicli), si ottengono un numero di copie dello stampo pari a $2n$.

In questo modo, teoricamente, dopo 20 cicli, da una sola copia se ne sono formate 10⁶, dopo 30 cicli 10⁷, e così via di seguito. Tale andamento esponenziale spiega la grande sensibilità della PCR nella messa in evidenza di quantità anche minime di DNA.

Il numero di cicli impostabili, inoltre, varia a seconda delle necessità e della quantità di partenza del campione di acido nucleico. Un ciclo completo di amplificazione che comprende le tre fasi, di denaturazione, annealing ed estensione, viene ripetuto solitamente da 25 a un massimo di 40 volte. Il limite superiore è imposto da alcuni problemi, che elencheremo di seguito:

- ingombro sterico (che aumenta la probabilità di appaiamenti aspecifici dei primers)
- terminazione dei primers nella mix di reazione
- diminuzione dell'efficienza dell'enzima nel tempo. Inoltre l'accumularsi a ogni ciclo, di gruppi fosfato derivati dai precursori (dNTP), a seguito dell'incorporazione di questi nel neo-filamento è anche un fattore che influisce negativamente sull'attività catalitica dell'enzima che di conseguenza viene inibita.

Da quanto detto appare evidente che è inutile superare i 40 cicli; nel caso in cui sia strettamente necessario disporre di una maggior quantità di prodotto, la maniera corretta di procedere consiste nell'allestire una seconda reazione di PCR partendo dal primo amplificato (4,13-15).

EVOLUZIONE DELLA PCR CLASSICA NELLA ATTUALE METODICA DI UTILIZZO

Il metodo proposto da Mullis, per superare i limiti della classica PCR ha rivoluzionato, la biologia molecolare e la genetica, non solo per la sua estrema utilità e sensibilità, ma an-

che per la sua semplicità di realizzazione, considerando il numero limitato di reagenti e di strumentazione richiesta.

La miscela di reazione deve contenere soltanto:

- DNA target, rappresentato da molecole di DNA, cDNA, o da frammenti di questi che fanno da stampo per l'enzima. L'estratto di DNA può essere lineare o circolare, mono o bicatenario, integro o degradato.
 - Primers (forward e reverse), cioè coppie di sequenze oligonucleotidiche ottenute per sintesi chimica e disegnate in modo tale da legarsi specificamente al template delimitando la zona di interesse da amplificare. Ogni coppia di primers ha le sue concentrazioni e condizioni ottimali di reazione, da determinare di volta in volta sperimentalmente ai fini della messa a punto di un protocollo di lavoro definitivo. Il disegno dei primers, oltre a essere deciso sulla base dell'importanza clinico-diagnostica del tratto di DNA che si vuole amplificare, deve anche tener conto di altri parametri come la lunghezza e la composizione in basi. Primers che superino di molto i 16nt di ampiezza o che contengano tratti di sequenze complementari alle due estremità, possono formare strutture secondarie abbastanza stabili causate da appaiamenti intramolecolari che diminuirebbero di conseguenza, la loro capacità di legarsi al template, quindi l'efficienza della reazione.
 - Desossiribonucleotidi, i "mattoni" con i quali la polimerasi costruisce ex novo, partendo dal primer e scorrendo lungo il target, nuove sequenze nucleotidiche.
 - DNA polimerasi; è importante ricordare che oltre alla Taq, sono oggi disponibili diverse Polimerasi termostabili (estratte da altri microrganismi termofili) solitamente ingegnerizzate per migliorarne le performances.
 - Soluzione tampone per PCR, costituita da KCl, Tris-HCl e MgCl₂ in concentrazioni diverse in relazione al protocollo sperimentale. Molto importante è la concentrazione dello ione magnesio che va ottimizzata in relazione alla presenza di agenti chelanti (EDTA) e di ioni carichi negativamente.
- Con questi accorgimenti Mullis poteva disporre, con la PCR, in non più di tre ore, di notevoli quantità di DNA, da sfruttare per offrire importanti informazioni diagnostiche e

di studio (4,9-12).

Usando primer specifici egli poteva identificare la presenza di un virus o di batteri, anche in quei pazienti in cui non si era ancora espressa una risposta immunitaria. (16,17) Con la PCR si possono attualmente identificare inoltre mutazioni a carico di alcuni geni per il controllo della crescita cellulare, e quindi implicati nell'insorgenza dei tumori (18-22).

L'analisi di sangue e di campioni di spermatozoi attraverso la PCR può fornire informazioni in casi di aggressioni e violenze carnali; inoltre, tale metodica, permette l'analisi e la ricostruzione del DNA prelevato da campioni antichi, amplificandone i rari frammenti sopravvissuti (10,23).

NASCITA DEI SISTEMI REAL TIME

Arrivati a questo punto, è necessario specificare, che come tutte le tecniche sperimentali innovative, anche la PCR è andata incontro a un processo di evoluzione che permette oggi di distinguere fra PCR classica e sistemi Real Time.

La differenza fra le due tecniche è nel metodo adottato per la rilevazione, che nel primo caso viene effettuata recuperando l'amplificato al termine della PCR (appunto per questo, la PCR classica viene anche chiamata PCR all'end point) (4,24).

Quindi, gli amplimeri vengono fatti correre all'interno di un gel per elettroforesi di agarosio o di poliacrilammide (PAGE) in base al tipo di definizione che si vuole ottenere.

È possibile di conseguenza, fare analisi qualitative e quantitative del prodotto riservando uno o più pozzetti del gel per il caricamento di controlli, che possano essere da riferimento per stabilire la lunghezza dei frammenti amplificati e indicativamente la loro concentrazione (25).

Nel sistema Real Time l'analisi quantitativa avviene già durante il processo di amplificazione e viene direttamente rilevata da un software, in quanto il Light Cycler è collegato a un computer, che permette all'operatore di visualizzare l'andamento della reazione sullo schermo (26).

L'analisi quantitativa è estremamente precisa e al termine del processo di amplificazione il sistema calcola la temperatura di melting dell'amplimero, cioè quella temperatura alla qua-

le il frammento di DNA amplificato è per il 50% della sua lunghezza denaturato.

La temperatura di melting è una misura importante in quanto permette di fare l'analisi qualitativa del prodotto di amplificazione e l'utilizzo dell'HRMM, si basa proprio sull'elaborazione fine di questo parametro.

La possibilità di disporre già durante il processo di amplificazione, di informazioni quantitative, è data su un dispositivo di rilevazione della fluorescenza, che viene emessa da opportuni fluorofori, che vengono aggiunti alla miscela di reazione (27,28).

Per meglio chiarire quanto detto sul sistema di rilevazione è bene approfondire le caratteristiche dei fluorofori utilizzati nei sistemi Real Time, considerando vari aspetti, tra cui accuratezza e costi, cercando magari di evidenziare nell'HRMM il giusto compromesso tra l'alta risoluzione dell'informazione data e il risparmio economico.

REAL TIME CON LA SYBR GREEN

Si tratta di un noto colorante fluorescente utilizzato nella biologia molecolare per vari scopi, quali identificazione delle bande di DNA nella gel elettroforesi, analisi quantitative di DNA in soluzione e nella Real Time viene impiegato per seguire le reazioni di amplificazione.

Si tratta di un composto organico aromatico facente parte del gruppo delle canine asimmetriche, molecole dotate di attività fluorofora.

Per le sue caratteristiche il SYBR GREEN è un colorante aspecifico simile all'etidio bromuro, ma presenta una sensibilità nella rilevazione, 25 volte maggiore rispetto all'etidio bromuro e si pensa sia meno pericoloso rispetto a quest'ultimo, che viene indicato come potente mutageno.

Ufficialmente, il SYBR GREEN viene considerato "non pericoloso", ma in virtù dell'elevata affinità con la quale lega il DNA occorre comunque prestare attenzione quando lo si maneggia, evitando assolutamente il diretto contatto con la pelle.

Un'altra caratteristica, che lo rende privilegiato rispetto al suo predecessore etidio bromuro, deriva dal fatto che la sua presenza nel DNA non impedisce l'attività di numerosi enzimi, tra cui quelli di restrizione, le ligasi e le DNA polimerasi, né impedisce il trasferimen-

to dell'acido nucleico a membrane per ibridizzazioni (Southern Blot) se viene aggiunto 0,1%-0,3% di SDS nei buffer di ibridizzazione; inoltre tale molecola è membrana-permeabile, cioè in grado di entrare in cellule ancora in vita.

Il SYBR GREEN si intercala nel DNA, preferibilmente quando questo si trova nella sua forma a doppio strand e quindi non è molto adatto per quantizzazioni di RNA o altro DNA contaminante a singolo filamento (primers, dNTP derivanti da PCR).

Una volta inseritosi all'interno della doppia elica si viene così a formare il complesso SYBR GREEN-DNA, che presenta un massimo picco di assorbimento nel blu, a 488 nm. Segue un decadimento radioattivo con emissione di luce nel verde, e più precisamente con un picco massimo a 522 nm. Altri picchi di assorbimento, sebbene più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto ($\lambda = 284$ nm e 382 nm).

Oltre al SYBR Green originale, sono stati sviluppati altri fluorofori simili leganti gli acidi nucleici, tra cui:

- SYBR Green II (lega preferenzialmente DNA a singolo filamento e RNA); ha caratteristiche simili al SYBR Green I ma ha un picco di assorbimento a 497 nm)
- SYBR Gold
- SYBR Safe (4,29)

REAL TIME CON LA HRMM

HRMM (High Resolution Melting Master 480) è un prodotto che, mediante l'utilizzo del nuovo sistema denominato LightCycler 480 real-time PCR, permette di ottenere curve di melting estremamente accurate, tali da consentire l'individuazione di polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, o "snips"), cioè variazioni puntiformi della sequenza.

Più precisamente l'HRMM è un fluoroforo che lega il DNA nella sua forma a doppio strand, e appartiene a una nuova famiglia di intercalanti, che legano il template saturandolo, cioè inserendosi base-base lungo la sequenza del DNA.

La formula chimica di questo intercalante, così come le sue caratteristiche chimico-fisiche, sono attualmente un segreto industriale. La differenza con i fluorofori tradizionalmente in uso, come SYBR GREEN ed Etidio Bromu-

ro, è che questi si inseriscono in maniera random e non saturante nella doppia elica. Grazie a questa sua caratteristica saturante, rispetto ai suoi predecessori, l'HRMM è in grado di rilevare la presenza di eteroduplex che si formano durante la PCR (per es. se il campione è un eterozigote per una particolare mutazione).

L'intercalante può essere utilizzato a elevate concentrazioni in quanto non interferisce con il funzionamento della polimerasi.

Fino ad oggi questa nuova generazione di fluorofori è stata testata per svariati scopi, ottenendo ottimi risultati seppur con qualche limitazione, che sarà approfondita più avanti (30,31).

INDAGINI MOLECOLARI SU ACIDI NUCLEICI

Il primo passo verso l'indagine molecolare sugli acidi nucleici parte dall'estrazione e dalla purificazione di questi dal campione, che viene eseguita facendo uso di enzimi proteolitici e solventi organici (10).

Solitamente i campioni che giungono al laboratorio sono prelievi di sangue, sia midollare che periferico (questo naturalmente dipende dal tipo di ricerca che si sta conducendo), scraping superficiali (ad esempio di cer-vice uterina o vulva), e tessuti di vario tipo (32-35), che prima di essere sottoposti al protocollo di estrazione del DNA, vanno incontro a un trattamento preliminare più o meno lungo, in base alle necessità imposte dalle caratteristiche del tessuto stesso o a eventuali trattamenti precedenti del tessuto che, per esempio, può essere stato incluso in paraffina per esame istologico (36).

Illustreremo, dunque, i vari protocolli adottati in base al tipo di campione da analizzare.

RECUPERO DI DNA DA TESSUTI INCLUSI IN PARAFFINA E DEPOSITI SU VETRINO

La paraffina è un materiale ceroso, quindi insolubile in acqua, è costituita da una miscela di idrocarburi a catena lunga e solidi a temperatura ambiente.

Tale composizione la rende particolarmente resistente all'attacco di solventi chimici acidi e spesso viene utilizzata per includere tessuti biologici in modo tale da ottenere, mediante taglio al microtomo, sottilissimi strati di tes-

suto che vengono depositati su vetrini e, previa colorazione, osservati al microscopio per indagini istologiche.

Occorre innanzi tutto rimuovere, con vari procedimenti, tale componente dal campione: questo è reso possibile solo mediante l'utilizzo di solventi organici date le caratteristiche chimico-fisiche della paraffina.

RECUPERO DI DNA DA TESSUTI CONGELATI

Fra i campioni pervenuti al laboratorio di biologia molecolare, alcuni consistono di biopsie di tessuti neoplastici generalmente asportati a seguito di intervento chirurgico o biopsia.

I campioni vengono subito processati, oppure dopo conservazione a -80°C , per ritardare ovviamente i processi di degradazione. Il prelievo del campione per la diagnosi molecolare è effettuato in area neoplastica, evitando per quanto possibile, zone necrotiche o componenti tissutali normali.

La massa tumorale si presenta frequentemente come un tessuto eterogeneo: accanto ad aree carcinomatose, possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche e componenti tissutali normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche, naturalmente risente molto della percentuale di cellule mutate nel campione e quindi delle caratteristiche dell'area di tessuto destinata all'analisi molecolare.

Tali caratteristiche prima dell'estrazione del DNA, devono essere accuratamente valutate: una volta individuata l'area esatta da sottoporre ad analisi, questa è sminuzzata con bisturi monouso fino a farle assumere la consistenza di un omogenato.

Seguono i vari passaggi qui sotto elencati:

- un volume pari a circa 50 μl dell'omogenato ottenuto è trasferito in sarsted da 1,5 ml, al quale si aggiungono 100 μl di soluzione di lisi e 4 μl di proteasi, per favorire l'ulteriore lisi del tessuto e la proteolisi delle deossiribonucleasi lisosomiali, che si liberano durante il trattamento.
- il campione è quindi incubato in termoblock a 55°C per 3 ore e successivamente trasferito in stufa a 37°C overnight. Alcuni campioni richiedono un tempo maggiore di incubazione, della durata anche di due o di tre giorni. A distanza di tempo è ne-

cessario andare ad aggiungere nuova soluzione di lisi e proteasi, a causa dell'inattivazione di quella messa precedentemente.

- una volta ottenuta la completa liquefazione del tessuto si può procedere alla fase successiva, che prevede l'inattivazione della proteasi mediante denaturazione a 95°C per 10 minuti. Questo è importante, in quanto, lo scopo finale è quello di andare a effettuare un'amplificazione utilizzando, ad esempio, l'HRMM e questo comporta l'utilizzo della Taq Polimerasi, che altrimenti, verrebbe degradata dalla proteasi al momento dell'allestimento dei capillari per la reazione.
- il campione, a questo punto, dopo opportuni lavaggi con acqua, è conservato a -20°C (11-15,37).

RECUPERO DEL DNA DA CAMPIONI DI SANGUE

I campioni di sangue sono generalmente utili per diagnosticare la presenza di mutazioni genetiche nel paziente o di anomalie biomolecolari determinate dalle metastasi.

Il sangue pervenuto in laboratorio viene trasferito all'interno di provette Vacutainer da 4ml contenenti l'anticoagulante sodio-eparina e un gel (a base di ficoll) che funge da mezzo di separazione delle diverse popolazioni di cellule in base alla loro densità.

La tecnica adottata per isolare le cellule è la centrifugazione isopicnica in gradiente di densità, dove il gradiente preformato è rappresentato da un gel. Dopo una centrifugazione a 3100 rpm per 21 minuti, gli eritrociti agglutinati e i granulociti si troveranno al di sotto del gel, mentre le cellule mononucleate (monociti, linfociti e altre cellule) si posizioneranno al di sopra di esso.

Il plasma sovrastante viene aspirato e allontanato fino a giungere in prossimità dell'anello linfocitario che appare come una nuvoletta bianca sospesa all'interno del mezzo al di sopra del gel, che quindi deve essere recuperato in una sarsted da 1,5 ml. Seguono una serie di lavaggi con acqua.

Il campione di cellule viene conservato a -2°C nell'attesa di essere processato (13,38,39).

CONCLUSIONI

Da quanto detto appare chiaro che la moderna biologia molecolare si avvale di sistemi

estremamente sofisticati e automatizzati, dotati di complessi software e di materiali delicati e complessi. Sin dalle origini, i ricercatori che si sono avvalsi della biologia molecolare nello studio dei tumori, si sono dovuti confrontare con notevoli complessità e difficoltà nella messa a punto delle tecniche. Dopo anni di sperimentazioni e tentativi, si è poi giunti, finalmente, alla nascita della PCR, che, dopo notevoli e progressivi perfezionamenti, si è trasformata nella moderna macchina replicante quale è. Da tale scoperta si poi passati alla nascita della Real Time, in cui il processo di amplificazione viene direttamente rilevato da un computer che permette all'operatore di visualizzare l'andamento della reazione sullo schermo, con estrema precisione.

Entrambe i metodi permettono di disporre di notevoli quantità di DNA tumorale, da sfruttare per scopi diagnostici e di studio, quali, ad esempio, l'identificazione di mutazioni geniche implicate nel controllo della crescita cellulare e, quindi, nell'insorgenza tumorale. Al giorno d'oggi non è pensabile ipotizzare lo studio dei tumori senza la presenza di questi presidi biomolecolari, che permettono l'identificazione di situazioni gnomiche non altrimenti individuabili in altro modo.

BIBLIOGRAFIA

1. Tinelli A, Leo G, Pisanò M, Mezzolla V, Storelli F, Montinari MR, Malvasi A. Utilizzo dell'instabilità dei microsattelliti (msi) come markers genomico nel carcinoma endometriale: evidenze scientifiche. *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2009, 21: N. 1: 49-61
2. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Malvasi A, Tinelli R. Hormonal carcinogenesis and sociobiological development factors in endometrial cancer: a clinical review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87:1101-1113
3. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Pisanò M, Malvasi A. An outlook on ovarian cancer and borderline ovarian tumors: focus on genomic and proteomic findings. *Current Genomics*, July 2009 (in press)
4. Dujols V, Kusakawa N, McKinney JT, Dobrowolsky SF, Wittwer CT. High-resolution melting analysis for scanning and genotyping. In: Tefvik D. *Real Time PCR*. Informa Healthcare-Taylor and Francis Editor, Abingdon, UK, 2006
5. Jost R, Berkowitz O, Masle J. Magnetic quantitative reverse transcription PCR: a high-throughput method for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR. *Biotechniques*. 2007 Aug;43(2):206-11
6. Gullicksen PS, Dean RG, Baile CA. Detection of DNA fragmentation and apoptotic proteins, and quantification of uncoupling protein expression by real-time RT-PCR in adipose tissue. *J Biochem Biophys Methods*. 2004 Jan 30;58(1):1-13
7. Levesque-Sergerie JP, Duquette M, Thibault C, Delbecchi L, Bissonnette N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*. 2007 Oct 22;8:93
8. Wang C, Kim T, Gao D, Vaglenov A, Kaltenboeck B. Rapid high-yield mRNA extraction for reverse-transcription PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2007 Apr 10;70(3):507-9
9. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):619-26
10. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem*. 2004 Dec 15;335(2):289-98
11. Martin I, Frank O. Real-time quantitative rt-PCR assays. *Methods Mol Biol*. 2004;238:231-8
12. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82
13. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*. 2004;50:1748-54
14. Takano EA, Mitchell G et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008;8(1):59
15. Margraf RL, Mao R et al. Rapid Diagnosis of MEN2B Using Unlabeled Probe Melting Analysis and the LightCycler 480 Instrument. *J Mol Diagn* 2008;10(2): 123-8
16. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect*. 2009 May;58(5):346-51
17. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Beveridge MG, Knudsen T, Milanovich J et al. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3690-702
18. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2008 Aug;27(8):415-21
19. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):55-9
20. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009 Feb;18(1):50-5
21. Du XL, Jiang T, Wen ZQ, Li QS, Gao R, Wang F. Differential expression profiling of gene response to ionizing radiation in two endometrial cancer cell lines with distinct radiosensitivities. *Oncol Rep*. 2009 Mar;21(3):625-34
22. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*. 2009 Apr;37(Pt 2):427-32
23. Picchiassi E, Coata G, Fanetti A, Centra M, Pennacchi L, Di Renzo GC. The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2008 Jun;28(6):525-30
24. Guan H, Yang K. RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2008;456:259-70
25. Bödör C, Schmidt O, Csernus B, Rajnai H, Szende B. DNA and RNA isolated from tissues processed by microwave-accelerated apparatus MFX-800-3 are suitable for subsequent PCR and Q-RT-PCR amplification. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(2):149-52
26. Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn*. 2009 Mar;11(2):93-101
27. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gra-

- tama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Dec 30
28. Sevestre H, Mention J, Lefebvre JF, Eb F, Hamdad F. Assessment of Chlamydia trachomatis infection by Cobas Amplicor PCR and in-house LightCycler assays using PreservCyt and 2-SP media in voluntary legal abortions. *J Med Microbiol.* 2009 Jan;58(Pt 1):59-64
29. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, You J, Hu XQ. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2009 Mar;21(3):673-9
30. Bengtsson M, Hemberg M, Rorsman P, Ståhlberg A. Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. *BMC Mol Biol.* 2008 Jul 17;9:63
31. Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT. Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jan;130(1):82-6.
32. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okai T. Detection and quantification of fetal DNA in maternal plasma by using LightCycler technology. *Methods Mol Biol.* 2008;444:231-8
33. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008 May 1;14(9):2535-42
34. Lattuada D, Colleoni F, Martinelli A, Garretto A, Magni R, Radaelli T, Cetin I. Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta. *Placenta.* 2008 Dec;29(12):1029-33
35. Jacobsson B, Aaltonen R, Rantakokko-Jalava K, Morken NH, Alanen A. Quantification of *Ureaplasma urealyticum* DNA in the amniotic fluid from patients in PTL and pPROM and its relation to inflammatory cytokine levels. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(1):63-70
36. Witchell J, Varshney D, Gajjar T, Wangoo A, Goyal M. RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract.* 2008;204(2):105-11
37. Li J, Wang L, Jänne PA, Makrigiorgos GM. Coamplification at lower denaturation temperature-PCR increases mutation-detection selectivity of TaqMan-based real-time PCR. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):748-56
38. Smith GD, Chadwick BE, et al. Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilising high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol* 2008;61(4): 487-93
39. Kang BY, Tsoi S, Zhu S, Su S, Kay HH. Differential gene expression profiling in HELLP syndrome placentas. *Reprod Sci.* 2008 Apr;15(3):285-94

Screening ecografico nel I trimestre: nostra esperienza

Rosa Maria Di Lauro*, Concettina Matarazzo*, Mariapia Foppoli, Ermete Valter Scotti, Benedetto De Pasquale

U.O. di Ostetricia e Ginecologia Azienda Ospedaliera della Valtellina e Valchiavenna, Presidio Ospedaliero di Sondalo (Direttore: Dott. B. De Pasquale)

*Operatori accreditati dalla Fetal Medicine Foundation

Riassunto

Negli ultimi anni è stato divulgato dalla Fetal Medicine Foundation lo screening ecografico per le anomalie cromosomiche che si basa sull'esecuzione di un'ecografia, effettuata da medici adeguatamente addestrati e certificati, e valuta il rischio di patologia cromosomica personalizzato per ogni paziente.

Nella nostra esperienza l'introduzione dello screening ecografico per la Sindrome di Down ci ha permesso di osservare che l'ecografia per la translucenza nucale consente una prima indagine morfologica fetale in un'epoca precoce, grazie alla migliore qualità degli ecografi, all'epoca gestazionale (11-14 settimane) e all'addestramento degli ecografisti secondo i criteri della Fetal Medicine Foundation

Parole chiave

Screening ecografico
Translucenza nucale
Malformazioni fetali

Summary

First trimester ultrasonographic screening: our experience

In the last years the Fetal Medicine Foundation has divulged the sonographic screening for chromosomal abnormalities. Such screening, that is based on an sonographic examination carried out by duly trained

INTRODUZIONE

Lo screening ecografico per la sindrome di Down si basa sull'esecuzione di un'ecografia nel primo trimestre della gravidanza allo scopo di identificare alcuni segni correlati alla sindrome e ad altre cromosomopatie. I segni ecografici che vengono valutati sono: lo spessore della translucenza nucale e la presenza dell'osso nasale, come valutazione di I livello. Altre valutazioni ecografiche di livello superiore (flusso tricuspidalico, flusso nel dotto venoso) sono effettuate da personale e da centri più specificatamente addestrati.

La translucenza nucale è la misurazione dello spessore della cute a livello della nuca, che può risultare aumentato per un accumulo di liquidi dovuto a varie cause (in 1/3 delle anomalie cromosomiche, affezioni cardiovascolari e polmonari, displasie scheletriche, infezioni congenite, malattie metaboliche ed ematologiche).

In occasione di quest'esame viene comunque effettuata una valutazione morfologica del feto, grazie anche all'alta qualità degli ecografi attualmente in uso che permettono una definizione migliore delle strutture esaminate. L'epoca di esecuzione dell'ecografia dello screening è compresa tra 11 + 3 e 13 + 6 giorni. In questo periodo è più facilmente realizzabile un'adeguata misurazione della translucenza nucale, ed è possibile visualizzare alcune strutture fetali rendendo possibile la diagnosi di molte anomalie maggiori (ad esem-

pio: onfalocele, anencefalia, anomalie degli arti, visualizzazione di stomaco e vescica, visualizzazione delle 4 camere cardiache) (1). In questo lavoro sono stati analizzati i dati della nostra casistica da quando abbiamo iniziato l'attività di screening ecografico, istituendo un ambulatorio per l'esecuzione dello screening, gestito da personale addestrato, certificato e sottoposto ad audit periodico da parte della Fetal Medicine Foundation di Londra. Questo Istituto provvede a fornire agli operatori certificati il software utilizzato per il calcolo del rischio personalizzato per la Sindrome di Down e per le trisomie 13 e 18.

Un importante requisito, come raccomandato dal gruppo di studio della Fetal Medicine Foundation, è costituito dall'addestramento degli ecografisti che eseguono lo screening (2). Il training è basato su un corso teorico e pratico in cui vengono fornite le istruzioni su come si ottiene una corretta misurazione della translucenza nucale e la visualizzazione dell'osso nasale. L'ecografista in seguito sottopone alcune immagini al giudizio degli esperti della Fetal Medicine Foundation e periodicamente sottopone la casistica personale e le foto (audit). Questo sistema garantisce uniformità nell'acquisizione delle immagini, fattore fondamentale nell'utilizzo del programma di screening (3,4,5,6).

Nella nostra casistica, limitata per ragioni geografiche e di bacino d'utenza, abbiamo comunque avuto modo di considerare che l'e-

and certified doctors, assesses the risk of chromosomal pathology for each patient. In our experience, the introduction of the ultrasound screening for the Down syndrome gave us the chance to observe that the sonographic examination for the nuchal translucency allows an early fetal morphologic investigation, thanks to a number of factors such as the better quality of ultrasound machines, the gestational age (11-14 weeks) and the training of the sonographers, according to the criteria set out by the Fetal Medicine Foundation.

Key word

Ultrasonografic Screening

Nuchal translucency

Fetal abnormalities

cografia di screening nel primo trimestre ha permesso di porre diagnosi in epoca precoce di alcune malformazioni maggiori che sarebbero state diagnosticate in epoca successiva ed erano sfuggite al momento dell'esecuzione della prima ecografia in gravidanza effettuata in un'epoca più precoce rispetto a quella dello screening.

Al di là del calcolo del rischio per la sindrome di Down, l'ecografia della translucenza nucale ci ha permesso di effettuare una prima valutazione morfologica del feto, come prevede il programma di screening divulgato in tutto il mondo dalla Fetal Medicine Foundation (1).

MATERIALI E METODI

Dal mese di aprile del 2005 nella nostra Unità operativa di ostetricia ginecologia è stato istituito un ambulatorio dedicato per l'esecuzione dell'esame della translucenza nucale. Il personale addetto all'esecuzione dell'esame, nei mesi precedenti, aveva completato il percorso formativo per l'esecuzione dell'esame secondo i criteri della Fetal Medicine Foundation. L'esame viene proposto come esame di screening a tutte le gravide, indipendentemente dall'età anagrafica, in occasione della prima visita o della prima ecografia in gravidanza. Alle gestanti viene consegnata un'informativa nella quale è spiegato in termini semplici e comprensibili lo scopo di quest'esame, le possibilità diagnostiche e i rischi sulla base dei dati estrapolati dalla letteratura. Molte pazienti non hanno conoscenza dell'esame e l'informativa, unitamente al colloquio con il medico, è necessaria per chiarire che i test di screening esprimono un risultato statistico di probabilità. Prima dell'esame si fa firmare un consenso informato nel quale si specifica che la translucenza nucale è un esame non diagnostico per le malattie cromosomiche ma che può costituire un'indicazione ad un'indagine prenatale invasiva, sempre rispettando la volontà della coppia. Contestualmente all'esame della translucenza, viene offerta la possibilità di effettuare il prelievo per il Bi-Test, per il dosaggio della PAPP-A e della Beta HCG libera nel siero materno.

I dati anagrafici della paziente e il risultato dell'esame ecografico, vengono inseriti nel programma computerizzato fornito dalla Fe-

tal Medicine Foundation e gli operatori che eseguono l'esame sono regolarmente sottoposti ad audit periodico con controllo della casistica e della qualità delle foto ottenute. Durante l'esame l'ecografista non si limita a valutare la translucenza nucale, ma effettua una valutazione morfologica del feto segnalando la normalità o anormalità di varie strutture: encefalo, stomaco, vescica, arti, estremità, osso nasale, parete addominale, quantità del liquido amniotico.

Per poter ottenere questi dati è necessario un tempo adeguato di osservazione, un'apparecchiatura di buona qualità ed esperienza dell'operatore (Figura 1).

L'ecografo utilizzato è un apparecchio dell'ALOKA (pro sound alfa 10), dotato di sonda trans addominale e transvaginale video-loop e seconda armonica.

Il rischio cut-off utilizzato per l'esecuzione dell'esame diagnostico invasivo di amniocentesi o di villocentesi è il rischio superiore a 1:350 o la translucenza nucale uguale o maggiore a 2,5 mm. Alle pazienti con translucenza nucale aumentata viene inoltre offerta la possibilità di una valutazione eco-cardiografica, anche in epoca precoce, presso un centro di II livello.

RISULTATI

Da Aprile 2005 fino ad aprile 2009 sono state effettuati 651 esami di translucenza nucale su un totale di 1450 parti, pari al 44,8% delle gravide seguite dal nostro centro, registrando un trend in aumento delle richieste (dal 36,6 % del 2005 al 56,90 % del 2008).

In tutte le pazienti esaminate si è ottenuta un'adeguata misurazione della translucenza nucale secondo i criteri della Fetal Medicine Foundation.

L'età media delle pazienti esaminate è di 30,93 anni, con un minimo di 19 ed un massimo di 44 anni. La maggior parte delle pazienti esaminate ha ottenuto un rischio calcolato basso; infatti 616 pari al 94,6 % del totale hanno un rischio > 1:1000.

Di queste pazienti 120 hanno un'età maggiore a 35 anni (18,4% delle pazienti esaminate). Sulla base della distribuzione dell'età materna ci si aspetta che la popolazione esaminata contenga 1,8 casi di trisomia 21 e approssimativamente lo stesso numero di casi di cromosomopatie.

Nelle pazienti esaminate si sono riscontrati 21 feti (pari a 3,2 % dei casi esaminati) con una misurazione della translucenza nucale maggiore o uguale a 2,5 mm. L'età media di queste pazienti è di 32,4 anni, con un minimo di 21 ed un massimo di 44 anni.

Le pazienti risultate a rischio per cut-off > 1:350 sono 23 (3,5%) con un'età media di 35,2 anni, le pazienti a rischio per NT > o = a 2,5mm sono 16 (2,5%) con un'età media di 32,6 anni. Le pazienti a rischio per entrambi i fattori 15 mentre 5 solo per NT aumentata. Nel totale delle pazienti esaminate sono stati accertati 5 casi di anomalie cromosomiche (0,76%), 2 pazienti hanno interrotto la gravidanza senza accertamento del cariotipo fetale e di una paziente non abbiamo il follow-up. Le 5 anomalie cromosomiche accertate sono: 3 trisomie 21, una traslocazione bilanciata, ed un cariotipo 47xxy. 2 delle tre trisomie (66,6%) presentavano un aumento della translucenza nucale (2,6 mm in una paziente di 33 anni e 5,3 mm in una paziente di 41 anni) e sono state identificate in epoca prenatale mediante villocentesi; il terzo caso di trisomia 21 presentava una translucenza normale (2,1 mm), con età materna di 36 anni, ed è stato diagnosticato alla nascita (unico caso falso negativo pari al 5,6% della casistica). Le altre due cromosomopatie sono state diagnosticate mediante amniocentesi, effettuata nel caso della traslocazione bilanciata per scelta della coppia, nel caso del cariotipo 47 XXY per bi test risultato a rischio.

Con l'esame ecografico, sono state diagnosticati 5 feti affetti da anomalie strutturali: 3 cardiopatie (di cui due con cariotipo normale ed un canale atrioventricolare associato a trisomia 21), un onfalocele con erniazione di tutti gli organi endoaddominali e un caso di ectromelia, con assenza di un arto inferiore di un gemello (in una gravidanza gemellare biamniotica, bicoriale) (Figure 2,3,4). Non è stato diagnosticato un caso di spina bifida con mielomeningocele, diagnosticato all'ecografia morfologica del II trimestre.

DISCUSSIONE

Dalla valutazione dei dati in nostro possesso si evince che lo screening ecografico delle anomalie cromosomiche da noi eseguito ha portato alla diagnosi precoce di 7 casi di feti patologici (1% delle gravide esaminate): 2

FIGURA 1. Esempio di misurazione corretta della translucenza nucale con contemporanea visualizzazione dell'osso nasale



FIGURA 2. Gravidanza gemellare bicoriale, biamniotica, con un feto affetto da ectromelia



con trisomia 21 e 5 feti con malformazioni maggiori.

Su 21 casi con translucenza nucale aumentata, 4 sono risultati patologici (per anomalia cromosomica o per cardiopatia) con un tasso di falsi positivi del 2,6%, mentre nelle pazienti con rischio > 1:350 i falsi positivi sono stati il 2,9% dei casi. Questo perché nel calcolo del rischio conta l'età materna che aumenta il numero dei falsi positivi.

Tenendo conto che la popolazione da noi studiata è una popolazione a basso rischio, con un'età media di 30,93 anni, l'esame del-

la translucenza nucale si è rivelato utile non solo ai fini della diagnosi di trisomia 21, con un solo caso falso negativo, ma ci ha permesso la diagnosi precoce di alcune malformazioni maggiori. Il 98,3 % delle pazienti ha effettuato un esame ecografico precedente all'esame della translucenza nucale. Le malformazioni diagnosticate erano dunque sfuggite al primo esame per l'epoca gestazione precoce.

Segnaliamo in particolare il caso della gravidanza gemellare con un feto affetto da ectromelia. La paziente dopo l'esecuzione dell'e-

FIGURA 3. Stesso caso della figura 2: feto affetto da ectromelia. Si nota l'assenza di un arto inferiore

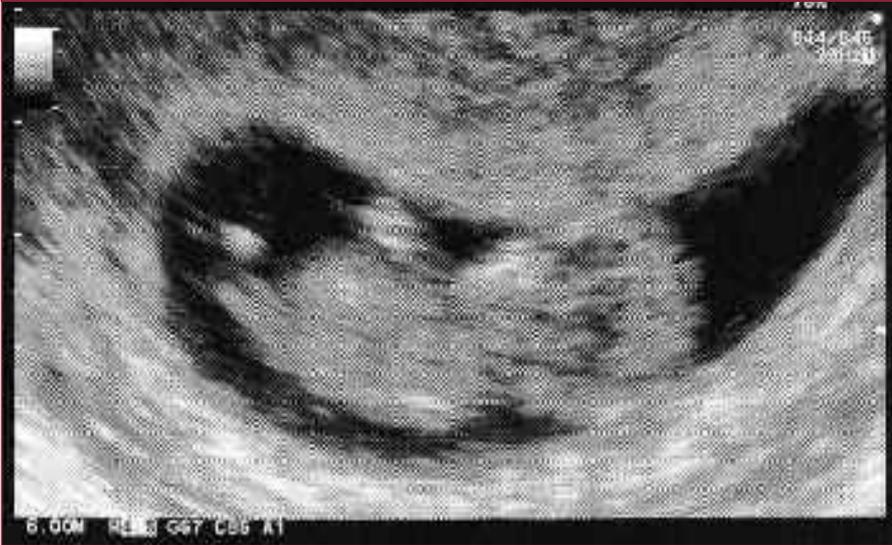


FIGURA 4. Caso di onfalocele. Erniazione degli organi endoaddominali



cografia per la translucenza nucale è stata valutata presso un centro di II livello dove ha potuto effettuare un'interruzione selettiva. Ha portato avanti la gravidanza fino al termine del II gemello sano, evitando una gravidanza gemellare con un feto affetto e con maggiori rischi materni e fetali.

CONCLUSIONI

Lo screening ecografico per le anomalie cromosomiche nel primo trimestre ha il vantaggio di una diagnosi prenatale più precoce

consentendo una gestione meno traumatica delle coppie che decidono d'interrompere la gravidanza. Ha lo svantaggio potenziale di identificare anche i casi che andrebbero incontro ad un aborto spontaneo (approssimativamente il 30% dei feti affetti tra 12 settimane e il termine)(7).

D'altra parte lo screening non invasivo ha permesso di ridurre la quota di test invasivi nella popolazione a basso rischio (annullando il numero di perdite fetali iatrogene) e consentito di scegliere il tipo di esame diagno-

stico invasivo (villocentesi o amniocentesi) sulla base di una personalizzazione del rischio.

L'accuratezza diagnostica dello screening ecografico della malformazioni fetali varia a seconda del rischio della popolazione esaminata. Nelle pazienti ad alto rischio lo screening è più semplice, essendo note le anomalie da ricercare. Lo screening ecografico su una popolazione ostetrica a basso rischio è più complesso dovendo prevedere un'accurata e sistematica valutazione dell'anatomia fetale. Tenendo conto però che l'80-90% dei casi di malformazioni si verifica nella popolazione a basso rischio (8), l'esecuzione dell'esame di translucenza nucale consente di effettuare anche un primo screening morfologico nelle gravide a basso rischio.

La translucenza nucale può essere misurata nel 99% dei casi. Lo screening ecografico identifica circa il 75% dei feti affetti da trisomia 21 con un tasso di falsi positivi di circa il 5%. Nella nostra casistica sono stati identificati 2 su 3 casi di sindrome di Down (66,6%) e 5 feti affetti da patologie morfologiche maggiori con un solo caso di spina bifida non diagnosticato all'epoca dello screening.

Considerando il basso rischio della popolazione che afferrisce al nostro centro, si può concludere che l'esame della translucenza nucale ci ha permesso di implementare le nostre capacità diagnostiche, anche grazie alla acquisizione corretta della tecnica di esecuzione dell'esame e di anticipare diagnosi di malformazioni maggiori, non evidenziabili nelle ecografie precedentemente eseguite.

BIBLIOGRAFIA

1. Nicolaides KH, MD. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* (2004); 191, 45-67
2. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *The Lancet* August 1. 1998; 352:343-346
3. Herman A, Dreazen E, Maymon R, Tovbin Y, Bukovsky I, Weinraub Z. Implementation of nuchal translucency image-scoring method during ongoing audit. *Ultrasound Obstet*

Gynecol 1999; 14:388-92

4. Snijders RJ, Thom EA, Zachary JM, Platt LD, Greene N, Jackson LG et al. First-trimester trisomy screening: nuchal translucency measurement training and quality assurance to correct and unify technique. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 19:353-9

5. Monni G, Zoppi MA, Ibba RM, Floris M.

Results of measurement of nuchal translucency before and after training. *Lancet* 1997; 350:1631

6. Braithwaite JM, Kadir RA, Pepera TA, Morris RW, Thompson PJ, Economides DL. Nuchal translucency measurement: training of potential examiners. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996; 8:192-5

7. Morris JK, Wald NJ, Watt HC. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenatal Diagn* 1999;19:142-5

8. Kuriak A, Kirkinen P, Latin V, Rajhvajn B. Diagnosis and assessment of fetal malformations and abnormalities by ultrasound. *J Perinat Med* 1980;8:219-35

Trattamento scleroembolizzante del varicocele pelvico femminile e della sindrome da congestione pelvica

Andrea Tinelli, Raffaele Prudeniano °, Massimo Torsello °, Flaviano Nicolaci, Cristiano Alex De Marzi, Fabrizio Totaro Aprile, Antonio Malvasi °°, Francesco Giuseppe Tinelli

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

° Unità Operativa di Radiologia, Ospedale "Vito Fazzi", Lecce

°° Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Clinica Santa Maria, Bari

Riassunto

Il dolore pelvico cronico è un problema comune e complesso che colpisce il 2-10% della popolazione ambulatoriale femminile e si sviluppa nel 15% delle donne fra i 18 e i 50 anni. In più del 90% dei casi, tali algie pelviche croniche possono essere associate a congestione pelvica venosa.

Qualora la diagnosi differenziale abbia escluso altre patologie, le algie associate a varicocele possono riflettere una Pelvic congestion syndrome (PCS), patologia associata ad incompetenza ovarica con dolore pelvico di intensità variabile, che incrementa con il flusso mestruale, con la posizione eretta, con l'affaticamento e con il coito.

La PCS si associa anche a tensione pelvica o perineale, a urgenza vescicale, mentre il dolore da PCS può essere mono o bilaterale, acuto e severo o cronico e fastidioso.

La diagnosi di varicocele pelvico e di PCS viene generalmente effettuata con ecografia transvaginale con eco ColorDoppler, ma si giova anche di venografia renale e di RMN e di TC.

Il trattamento della PCS avviene generalmente occludendo il varicocele, mediante trattamento chirurgico o radiologico interventistico, ma è quest'ultimo quello attualmente più utilizzato, in quanto permette di superare agevolmente lo scoglio della

INTRODUZIONE

Il varicocele femminile, meglio definito come insufficienza venosa pelvica, fu descritto per la prima volta da Taylor nel 1949 e, ancora adesso, è una patologia tuttavia meno conosciuta, e quindi meno studiata, del varicocele maschile (1).

Il varicocele pelvico femminile si associa, nel 100% dei casi, a dolore pelvico cronico, e tale patologia viene definita, a livello internazionale, come "Pelvic congestion syndrome" (PCS); essa è facilmente riscontrabile in coincidenza con il ciclo mestruale, si associa a dispareunia, nel 40% dei casi, e a dismenorrea nel 15% dei casi, ma non si associa mai a problemi di fertilità (2).

Al contrario, nel 60% delle PCS si riscontrano varicosità diffuse con presenza di ectasia dei plessi venosi dei seguenti distretti: ovarici, ipogastrici, iliaci esterni, perineali, vulvari, emorroidari, inguinali e sovrapubici, associati, o meno, a incontinenza safenica, incontinenza di collaterali di crosse ed esiti di safenectomia interna (3). Difatti, dal punto di vista fisiopatologico, si è in presenza di varici quando le valvole per la continenza venosa, che aiutano il ritorno venoso al cuore contro la forza di gravità, si sfiancano e non si chiudono più in maniera corretta; ciò permette al sangue di ristagnare nelle vene, determinando un aumento pressorio intravenoso con l'insufficienza che sostiene la sindrome varicosa pelvica.

PELVIC CONGESTION SYNDROME (PCS)

Dalla letteratura scientifica in merito viene riportato che circa un terzo delle donne, durante il corso della propria vita, riferiscono algie pelviche ricorrenti non meglio definite. Molte di queste pazienti vengono inquadrare addirittura come pazienti con algie "psicosomatiche", ma recenti riscontri scientifici hanno inquadrato e classificato tali disturbi come riferibili a varicosità venose pelviche, meglio definite, dal punto di vista terminologico, come PCS (pelvic congestion syndrome). L'origine della PCS è da ricercarsi nella modificazione pascolo-ormonale determinata dalla gravidanza e dall'assenza congenita di valvole delle vene ovariche, che generano un rigurgito di sangue venoso a livello pelvico, con reflusso a livello delle vene iliache interne (4).

L'incontinenza delle vene ovariche, con il conseguente reflusso a valle nelle vene del sistema salpingo-ovarico, determina dunque la PCS con dolore pelvico cronico, associato a varici del pavimento pelvico (vulvari e perineali) e varici ectopiche delle vene della coscia con le quali comunicano (5).

Le cause, quindi, delle algie pelviche croniche femminili sono varie, ma spesso si associano alla presenza di varicosità venose dei plessi ovarici e pelvici, giacché le manifestazioni cliniche della PCS sono simili a quelle

sala operatoria e dell'anestesia generale, con l'embolizzazione delle vene ovariche o iliache, da eseguire in breve tempo e in anestesia locale.

Parole chiave

Varicocele pelvico
Dolore pelvico cronico
Pelvic congestion syndrome
ecoColor Doppler
Embolizzazione

Summary

Scleroembolization Treatment of Pelvic Female Varicocele and of Pelvic Congestion Syndrome

Chronic pelvic pain is a common and serious problem among women, it accounts for 2-10% of outpatient gynecological consultations and it is said to occur in 15% of all women between the ages of 18 and 50 years. Many epidemiological gynecological reports showed that, in more than 90% of cases, this chronic pain is associated to a marked pelvic venous congestion, as pelvic varicocele.

Whenever it is excluded other diseases, patient affected by pelvic venous congestion shows a Pelvic congestion syndrome (PCS), a condition associated with ovarian veins incompetence.

This syndrome shows a pelvic pain of variable intensity that is heightened before or during menses and that is aggravated by prolonged standing, fatigue, and coitus, women affected by PCS also may report pelvic or perineal heaviness and bladder urgency.

The pain associated with PCS, which may be unilateral or bilateral, can be acute and severe or has been described as being chronic and dull.

The pelvic varicocele and PCS diagnosis may be done by ultrasonography by transvaginal ecoDoppler or by renal vein contrastography or by CT. The varicocele treatment can be done by ligation of expanded vessels of varicocele, either by surgery or radiology; this last radiological approach is currently the more indicated, since overpass the surgical theatre and the general anesthesia, by ovarian veins and iliac vein embolization, to perform in a short time and in local anesthesia.

delle varicosità venose femminili agli arti inferiori (4).

La PCS dimostra un aumento della frequenza nella vena ovarica sinistra per ragioni anatomiche: la vena ovarica di sinistra drena direttamente nella vena renale sinistra, mentre a destra drena direttamente nella vena cava, inferiormente alla vena renale destra (6). Possono essere presenti varianti anatomiche in una discreta percentuale di casi (10-35%). A livello pelvico, le varicosità venose si riscontrano a livello ovarico principalmente, poi a livello di utero e vulva, ma tutte determinano dolore pelvico (4).

EPIDEMIOLOGIA DEL VARICOCELE PELVICO E DELLA PCS

Dal punto di vista statistico, la distribuzione epidemiologica del varicocele pelvico non è facilmente inquadrabile.

In accordo con la Society of Interventional Radiology (SIR) annualmente migliaia di donne si sottopongono ad interventi chirurgici per trattare disturbi della fertilità e, una parte di queste presenta occasionalmente un varicocele pelvico (8).

Difatti, sempre secondo statistiche radiologiche, circa il 15% delle pazienti fra i 20 e i 50 anni presenta delle varicosità venose pelviche, anche in assenza di sintomatologia algica; inoltre la presenza di varicocele pelvico è correlata a pregresse gestazioni, per cui, maggiore è il numero di gravidanze espletate, maggiore è il rischio di varicocele pelvico, soprattutto a livello ovarico (9).

In seguito a tali premesse è facilmente comprensibile come la PCS sia inusuale in donne che non hanno mai partorito, mentre le algie pelviche croniche collegabili a tali disturbi siano molto diffuse, sino a comprendere il 15% dei disturbi lamentati dalle pazienti dalle pazienti che si sottopongono a visita ginecologica.

Report scientifici riferiscono che circa il 30% delle pazienti con algie pelviche croniche hanno dunque una PCS come unica e sola causa del disturbo, mentre il 15% di queste presentano una PCS associata ad un'altra patologia pelvica. 10

I maggiori fattori di rischio della PCS sono dunque: due o più gravidanze con variazioni additive dei livelli ormonali basali, rigon-

fiamiento delle vene degli arti inferiori, ovaie policistiche e disturbi dei livelli basali ormonali, con eccessiva fluttuazione nella produzione degli stessi (11).

SINTOMATOLOGIA

DEL VARICOCELE PELVICO

Dal punto di vista sintomatico, nella definizione del quadro clinico di "dolore pelvico cronico" femminile, soprattutto della giovane donna multipara, generalmente non viene ricercata la presenza di dilatazioni varicose delle vene ovariche.

Molte delle pazienti che lamentano tale disturbo riferiscono anche dolore pelvico mono o bilaterale, cronico e fastidioso, associato o meno a algie a localizzazione peri ovarica, senso di peso addominale, irritabilità vescicale e gonfiore al basso ventre (10).

Il dolore pelvico cronico che si associa al varicocele pelvico femminile o alla PCS è solitamente un fastidio noioso e doloroso, si genera a livello del basso addome e si riflette a livello lombo-sacrale, con aumento dell'intensità nel periodo intermestruale o mestruale, dopo eccessiva stazione eretta, in seguito a sforzi fisici, a fine giornata, nel corso della gravidanza o durante o alla fine dei rapporti sessuali, successivamente alla penetrazione e inseguito alle spinte intravaginale del pene sulla cervice uterina e nella pelvi (12).

Altri sintomi potenzialmente presenti in questa patologia includono l'AUB (abnormal menstrual bleeding), le perdite vaginali atipiche, le varicosità venose vulvari, perineali o peri-anali, motivo per cui molte delle pazienti affette da PCS sono spesso ansiose e facilmente irritabili (13).

E' inoltre di comune riscontro la possibile formazione di recidive di varici in pazienti già sottoposte ad interventi per la correzione di varici degli arti inferiori, espressione del reflusso proveniente dal plesso ovarico o ipogastrico (13).

DIAGNOSTICA

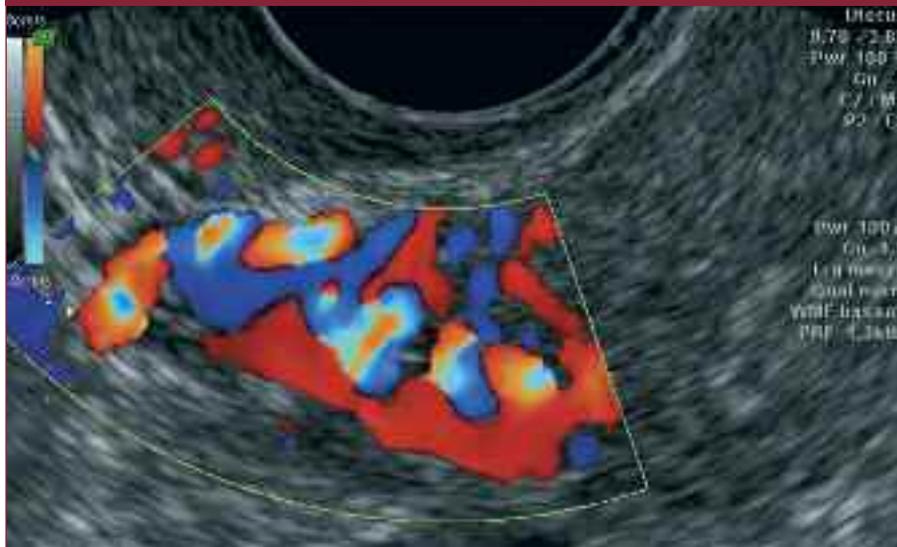
DEL VARICOCELE PELVICO

La diagnosi di varicocele pelvico origina quasi sempre dalla sommatoria di due parametri: il dato sintomatologico e il dato morfologico, derivante da un'immagine di vene ovariche incompetenti o dilatate, associate a con-

Key word

Pelvic varicocele
 Chronic pelvic pain
 Pelvic congestion syndrome
 ecoColor Doppler
 Embolizations

FIGURA 1. Immagine ecografica transvaginale, con colorDoppler, di Varicocele Pelvico Sx in paziente di 38 anni, pluripara (2 parti: uno spontaneo e un taglio cesareo), con spiccata PCS



gestione venosa pelvica (14).

In presenza della suddetta sintomatologia algica femminile, la diagnosi viene sempre confermata con l'imaging; l'eco-color-doppler transvaginale è l'esame principe, per facilità di esecuzione e riproducibilità, che fornisce con alta attendibilità diagnostica un quadro completo dell'anatomia delle vene pelviche e delle loro anastomosi con le vene addominali e degli arti inferiori (15, 16).

Altro esame che conferma tale sospetto patologico è la flebografia renale e selettiva ovarica.

Tale indagine un tempo "gold standard" è oggi ritenuta obsoleta e completamente soppiantata dalla angio-RM ad elevato campo-gradiente, mentre la TC (tomografia computerizzata) con mezzo di contrasto iodato attualmente riveste scarso significato diagnostico (17).

La RM (meglio angio-RM) è attualmente l'esame di II istanza di riferimento per quanto riguarda lo studio del varicocele pelvico e dell'apparato genitale femminile in genere, l'utilizzo di sonde dedicate endocavitari ne ha ulteriormente ampliato i confini diagnostici specialmente per lo studio della patologia neoplastica.

Con tale metodica è possibile, attraverso lo studio multiplanare diretto prima, e con ricostruzioni in post-processing poi (MIP-3D), ot-

tenere una esatta rappresentazione di tutto il territorio vascolare venoso pelvico nonché di tutte le possibili varianti anatomiche che rappresentano ancora oggi la principale causa di insuccesso tecnico di scleroembolizzazione retrograda.

È quindi auspicabile eseguire questo esame preliminare oltre che un ecocolor-doppler endocavitario che rispetti i requisiti mini di qualità.

I TRATTAMENTI DEL VARICOCELE PELVICO: METODICHE A CONFRONTO

Scopo del trattamento cruento è l'interruzione del flusso venoso a carico della vena ovarica.

Tale blocco può avvenire mediante legatura chirurgica della vena ovarica interessata o con l'interruzione del flusso con occlusione della vena mediante iniezione di sostanze sclerosanti.

TRATTAMENTO CHIRURGICO DEL VARICOCELE PELVICO

Si rende quindi necessario accesso laparotomico al fianco, in anestesia generale, con successiva legatura diretta della vena ovarica, anche se tale intervento è stato poi sostituito da quello laparoscopico.

La laparoscopia operativa viene generalmente eseguita in anestesia generale, con intuba-

FIGURA 2. Immagine angiografica di Varicocele Pelvico Sx in paziente di 38 anni, pluripara (2 parti), con spiccata PCS; è ben visibile nella parte sinistra del riquadro la dilatazione del plesso venoso ovarico sx, dopo iniezione del mezzo di contrasto iodato



zione endotracheale; l'intestino tenue viene generalmente mobilizzato, per meglio identificare la fossa mesenterico-parietale nella plica duodenale inferiore.

La vena ovarica destra viene approcciata incidendo il peritoneo posteriore che ricopre la vena cava inferiore 2 cm sotto la fossa mesenterico-parietale. L'uretere destro viene identificato e dislocato lateralmente; si clamp la vena ovarica, liberata dal tessuto areolare retro peritoneale, con 2 o 3 clips posizionate vicino all'origine della vena, in prossimità della cava inferiore.

La vena ovarica sinistra può essere anche approcciata a livello ovarico, liberata dal tessuto periareolare retro peritoneale, procedendo distalmente sino alla vena renale di sinistra. In alternativa, la vena ovarica sinistra può essere intercettata incidendo il peritoneo posteriore che ricopre l'area addominale 2 cm sotto la plica duodenale; dopo aver identificato l'uretere sinistro, l'arteria e la vena mesenterica inferiore, la vena ovarica sinistra viene identificata mediante trazione con pinza

atraumatica, per poter dunque osservare il consensuale movimento dell'ovaio. Una volta sicuri di aver intercettato la vena ovarica di sinistra, si applicano 2 o 3 clips all'origine della vena ovarica, in prossimità della vena renale sinistra.

Alcuni Autori hanno riportato in letteratura la loro esperienza laparoscopica, mediante applicazione di clips sulle vene ovariche, dissecate laparoscopicamente dalle omologhe arterie o mediante coagulazione e sezione delle vene con pinze elettrocoagulanti e forbici (18).

In alcuni centri, la terapia del varicocele pelvico consiste nella sclerosi endovasale percutanea e tale intervento viene eseguito senza necessità di anestesia generale in Day Hospital (19).

La sclerosi laparoscopica del varicocele pelvico è una procedura che richiede circa 3 giorni di ricovero; difatti, anche se resta un trattamento mini-invasivo, tale tecnica comporta il ricovero ospedaliero, gli esami di routine e l'esecuzione di un'anestesia generale,

con i giorni di degenza nel post-operatorio.

TRATTAMENTO RADIOLOGICO-INTERVENTISTICO DEL VARICOCELE PELVICO

Dal punto di vista terminologico, il trattamento percutaneo del varicocele pelvico femminile viene definito come: "Non-surgical procedure for painful ovarian varicose veins" (20).

La scleroembolizzazione retrograda appartiene a questo gruppo di procedure "non surgical", altrimenti dette "mini-invasive", eseguite senza alcun accesso chirurgico, sotto guida fluoroscopica a raggi X.

Si esegue inizialmente una anestesia locale in sede inguinale dx, successivamente si incannula la vena femorale comune e si posiziona un intraduttore venoso: attraverso tale intraduttore si fa avanzare il catetere che incannulerà la vena renale sn e successivamente la vena ovarica.

Per eseguire il cateterismo superselettivo della vena ovarica può essere di ausilio una guida angiografica idrofilica; si esegue la flebografia ovarica con documentazione di tutto il distretto venoso patologico annessiale e di eventuali varianti anatomiche (vena ovarica doppia, tripla, anastomosi ovo-ovariche, anastomosi patologiche con rami della vena ipogastrica, delle vene sacrali o del distretto mesenterico) (21).

Una volta raggiunto il distretto venoso patologico in sede annessiale e si inietta la sostanza sclerosante che determina occlusione e sclerosi immediata del circolo venoso patologico (22).

Successivamente si esegue sclerosi della vena ovarica fino a poco sotto l'origine dalla vena renale (5-10 cm) iniettando la schiuma dal catetere portante.

L'iniezione finale di mdc iodato dal catetere portante né visualizzerà il ristagno segno dell'avvenuta sclerosi; si lascia, infine, in sede il catetere portante in occlusione per circa 5-10 min che poi verrà rimosso.

La paziente viene dimessa quindi dopo qualche ora dopo dalla procedura e consigliato riposo domiciliare per 2 giorni e successiva ripresa della vita normale, con astensione da attività sportive e fisiche importanti per 3 settimane.

La ripresa funzionale dell'ovaio colpito dal

varicocele, grazie ai circoli collaterali, è generalmente immediata, non produce anomalie nella produzione ormonale e, solo in casi sporadici, sono stati riscontrati casi di mal funzionamento ovarico.

SCLEROEMBOLIZZAZIONE DEL VARICOCELE PELVICO FEMMINILE: NOSTRA ESPERIENZA

Nel nostro Ospedale, grazie alla collaborazione con l'U.O. di Ginecologia e Ostetricia e l'U.O. di Radiodiagnostica, a partire dal 2006 abbiamo già eseguito varie procedure mini-invasive per il trattamento di alcune patologie ginecologiche e, in particolare, anche in caso di varicocele pelvico.

La nostra collaborazione permette un totale accordo e condivisione dei protocolli diagnostico-operativi; difatti, dopo aver eseguito tutte le visite e gli accertamenti di rito, con particolare riguardo ad un eco colorDoppler ovarico bilaterale, la paziente viene ricoverata in regime di Day Hospital-Day Surgery ginecologico-chirurgico, con la diagnosi di varicocele pelvico destro o sinistro.

La procedura di programmazione del ricovero richiede alcune puntualizzazioni; innanzitutto la paziente deve eseguire, nel pre-ricovero, gli esami essenziali per poter ricevere il mezzo di contrasto e cioè il dosaggio della creatinemia, l'elettroforesi proteica ed un ECG, associando sempre un RX torace (per eventuale intervento dell'anestesista) e un adeguato consenso informato alla procedura.

Si ricorda che gli esami preliminari per il mezzo di contrasto devono sempre essere effettuati in quanto, nel corso della procedura viene sempre introdotto, nel torrente circolatorio, del comune mezzo di contrasto iodato idrosolubile, identico a quello usato per la TC.

Al momento del ricovero, prima di espletare la procedura, alla paziente viene eseguito un'eco pelvico con color-Doppler che conferma la presenza del varicocele (Figura 1) e, successivamente, viene incannulata una vena periferica; prima di eseguire la scleroembolizzazione è sempre consigliabile eseguire una depilazione in sede inguinale destra.

Eventuali allergie al mezzo di contrasto o all'anestetico locale o eventuali atopie generiche devono essere segnalate per poter una

FIGURA 3. Immagine angiografica di Varicocele Pelvico Sx della stessa paziente con spiccata PCS; è ben visibile nella parte sinistra del riquadro la chiusura, dopo iniezione di sostanza sclerosante, del plesso venoso ovarico sx, escluso dal mezzo di contrasto iodato



preparazione "short term" anti-allergica, nel pre-operatorio.

È consigliabile, a volte, somministrare una dose di benzodiazepina, preferibilmente Midazolam (Ipnovel), mezz'ora prima di iniziare la procedura, al fine di tranquillizzare la donna, se agitata.

Come antibiotico-terapia è preferibile utilizzare l'eritromicina per os, 1 grammo per 2 volte al giorno, sia un giorno prima della procedura che per i 4 giorni successivi o, in alternativa, il ceftriaxone.

Si può anche associare una profilassi antiembolica, sulla scorta delle esperienze dei vari Centri; noi consigliamo 4000 U.I. di eparina a basso peso molecolare la mattina prima dell'embolizzazione e 2000 U.I. al giorno per altri due giorni dopo la procedura.

Consigliabile sempre una gastroprotezione un giorno prima della procedura e per gli altri 5-7 giorni successivi.

Per l'eventuale dolore iniziale da procedura, noi abbiamo effettuato una terapia antiflogistica-analgésica con FANS per i successivi 5-7 giorni successivi alla procedura mentre per il possibile dolore durante l'esecuzione del-

la scleroembolizzazione è possibile utilizzare una flebo con ketorolac o tramadolo durante l'embolizzazione.

Discutiamo ora le modifiche da noi introdotte nella tecnica classica sulla scorta dell'esperienza acquisita e confrontata con quella della letteratura scientifica.

Dopo aver posizionato la paziente sul campo operatorio, disinfettato la zona di introduzione del catetere e applicato il campo sterile, una volta eseguita l'anestesia locale in sede inguinale dx, generalmente incannuliamo la vena femorale comune e posizioniamo l'introduttore venoso (Cordis da 6F).

Attraverso tale via di accesso, si fa avanzare un catetere (di Cook) con cateterismo della vena renale sn e successivamente la vena ovarica e, in ausilio al cateterismo superselettivo della vena ovarica, utilizziamo una guida angiografica idrofilica (Terumo 35J; 150 CM).

Una volta eseguita la flebografia ovarica con documentazione di tutto il distretto venoso patologico annessiale (Figura 2) e di eventuali varianti anatomiche, facendo avanzare il microcatetere coassiale (Progreat Terumo 2.7 F, 130 CM) per raggiungere il distretto ve-

noso patologico in sede annessiale, si inietta una miscela di atossiclerol 3% e aria in schiuma (2cc+2cc) con conseguente occlusione e sclerosi immediata del circolo venoso patologico.

Dopo tale manovra, terminiamo la procedura con la sclerosi finale della vena ovarica sino a poco al di sotto dell'origine dalla vena renale (a 5-10 cm) iniettando la "schiuma" dal catetere portante in uscita.

L'iniezione finale di pochi cc di m.d.c. iodato dal catetere portante visualizza il ristagno che è il segno diretto dell'avvenuta sclerosi e occlusione venosa (Figura 3); il tutto termina con il catetere portante lasciato in occlusione per circa 5-10 min e successiva rimozione dal corpo della paziente.

Al termine della procedura non è mai necessario applicare punti di sutura in quanto non vi è alcuna incisione chirurgica né esposizione di strutture anatomiche, tranne l'esecuzione di un piccolo accesso, di circa 1 mm, con puntura percutanea in sede inguinale.

Nel decorso post-operatorio, già dopo 2-3 ore dalla procedura le pazienti possono alzarsi in piedi, andare in bagno a svuotare la vescica e consumare un pasto leggero già a distanza di 6 ore dalla procedura.

Generalmente la maggior parte delle pazienti vengono dimessa alcune qualche ora dopo la fine della procedura, mentre qualcuna preferisce la mattina successiva.

Riesaminando i risultati delle pazienti da noi operate, è possibile affermare che tutte le pazienti riportano la guarigione dai fastidi e l'assenza di complicanze importanti nel post-operatorio, tranne un caso di febbre (< a 38°C) e algie pelviche, entrambe regredite con trattamento farmacologico.

Alle pazienti viene consigliato il riposo domiciliare per i 2 giorni successivi alla dimissione, con successiva ripresa della normale attività nel terzo giorno, astenendosi dall'attività sportiva e dal lavoro fisico pesante per le tre settimane post-intervento.

La ripresa dell'attività sessuale invece è stata invece praticamente immediata e, a quanto riferito dalle nostre pazienti, non più dolorosa e alquanto soddisfacente.

Il controllo ecografico del varicocele pelvico, con eco-colorDoppler, deve sempre essere eseguito alla dimissione, dopo 30 giorni e, facoltativamente, dopo 6 mesi dal tratta-

to, in quanto il monitoraggio degli esiti permette di conoscere adeguatamente il grado di risoluzione del problema.

ESPOSIZIONE RADIOLOGICA PER SCLEROEMBOLIZZAZIONE DEL VARICOCELE PELVICO

L'esposizione radiologica degli operatori e della paziente è notevolmente ridotta grazie alla estrema velocità con cui si esegue la procedura vera e propria; difatti, gli operatori raggiungono la vena ovarica in breve tempo grazie anche ai nuovi materiali sempre più biocompatibili e flessibili e alle scopie "a basso dosaggio" ma ad alta risoluzione.

Il tempo medio di scopia, per singola paziente, è variabile da 50 secondi fino a 10 minuti nei casi più complessi, ma con una media di 3-4 minuti a paziente (21).

La RM eseguita preventivamente può ridurre nettamente i tempi di scopia per la preventiva visualizzazione esatta della sede dell'ostio della vena ovarica e di eventuali piccole anomalie che ne "allungherebbero" inutilmente i tempi e l'esposizione radiologica.

COMPLICANZE DELLA PROCEDURA E RECIDIVE.

Nel 7-10% dei casi, per la presenza di varianti anatomiche o vere e proprie anomalie vascolari, non è possibile entrare con il catetere nella vena ovarica e la paziente verrà quindi trattata con metodiche chirurgiche alternative (22).

La visualizzazione della vena ovarica all'angolo-RM può ridurre fino ad azzerare gli insuccessi.

Le recidive ad un anno, dopo sclero-embolizzazione, sono alquanto rare, se non eccezionali.

La procedura è stata sviluppata infatti proprio come trattamento elettivo delle recidive post-operatorie e si è ovviamente estesa al varicocele primitivo, per la sua ridottissima invasività anche in virtù dell'utilizzo dei nuovi materiali angiografici sempre più flessibili e biocompatibili.

Ciononostante, sono sempre possibili comparse di recidive, anche a distanza di 10-20 anni dal trattamento (23).

Avendo però superato il periodo fertile, le possibili ma improbabili recidive rivestono generalmente scarso significato clinico, di-

fatti la menopausa di per sé riduce nettamente i sintomi da varicocele pelvico.

CONCLUSIONI

La scleroembolizzazione retrograda del varicocele pelvico è oggi in trattamento di scelta per la ridotta invasività, per l'assenza di esposizione chirurgica di strutture anatomiche e di complicanze post-operatorie importanti.

La semplicità, l'essenzialità, l'assenza di qualsiasi problematica legata all'anestesia generale, nonché l'elevato indice di gradimento da parte delle pazienti, ha decretato obsoleta qualsiasi altra alternativa terapeutica invasiva del varicocele pelvico, determinandone la preferenza per questa procedura che, in mano esperte, rappresenta oggi una dei tanti "traguardi" della medicina moderna.

BIBLIOGRAFIA

1. Giacchetto C, Cotroneo GB, Marincolo F, Cammisuli F, Caruso G, Catizone F. Ovarian varicocele: ultrasonic and phlebographic evaluation. *J Clin Ultrasound* 1990;18:551-555
2. Beard RW, Pearce S, Highman JH, Reginald PW. Diagnosis of pelvic varicosities in women with chronic pelvic pain. *Lancet* 1984;2:946-949.
3. Reiter RC. A profile of women with chronic pelvic pain. *Clin Obstet Gynecol* 1990;33:130-136
4. Hobbs JT. The pelvic congestion syndrome. *Br J Hosp Med* 1990;43:200-206
5. Cordts PR, Eclavea A, Buckley PJ, DeMaio-ribus CA, Cockerill ML, Yeager TD. Pelvic congestion syndrome: early clinical results after transcatheter ovarian vein embolization. *J Vasc Surg* 1998;28:862-868
6. Giacchetto C, Catizone F, Cotroneo GB, et al. Radiologic anatomy of the genital venous system in female patients with varicocele. *Surg Gynecol Obstet* 1989;169:403-407
7. Edlundh KO. Pelvic varicosities in women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1964;43:399-407
8. Gültaşlı NZ, Kurt A, İpek A, Gümüş M, Yazıcıoğlu KR, Dolmen G, Taş I. The relation between pelvic varicose veins, chronic pelvic pain and lower extremity venous insufficiency in women. *Diagn Interv Radiol* 2006; 12:34-38
9. Maleux G, Stockx L, Wilms G, Marchal G. Ovarian vein embolization for the treatment

of pelvic congestion syndrome: long-term technical and clinical results. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:859-864

10. Nicholson T, Basile A. Pelvic Congestion Syndrome, Who Should We Treat and How? *Tech Vasc Interventional Rad* 2006; 9:19-23

11. Bennett W. Varicocele, particularly with reference to its radical cure. *Lancet* 1889;1:261-5

12. Beard RW, Reginald PW, Wadsworth J: Clinical features of women with chronic lower abdominal pain and pelvic congestion. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;95:153-161

13. La Nasa JA Jr, Lewis RW. Varicocele and its surgical management. *Urol Clin North Am* 1987;14:127-36

14. Harris RD, Holtzman SR, Poppe AM: Clinical outcome in female patients with pelvic pain and normal pelvic ultrasound findings.

Radiology 2000;216:440-443

15. Hodgson TJ, Reed MWR, Peck RJ, Hemingway AP. The ultrasound and Doppler appearances of pelvic varices. *Clin Radiol* 1993;44:208-9

16. Mayer AL, Machan LS. Correlation of ultrasound and venographic findings in pelvic congestion syndrome. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11[suppl]:221

17. Capasso P, Simons C, Trotteur G, Dondelinger RF, Henroteaux D, Gaspard U. Treatment of symptomatic pelvic varices by ovarian vein embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1997;20:107-11

18. Takeuchi K, Mochizuki M, Kitagaki S. Laparoscopic varicocele ligation for pelvic congestion syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 1996; 55:177-178

19. Machan L, Vogelzang R. Interventional ra-

diologic diagnosis and embolization of ovarian varicoceles in the treatment of chronic pelvic pain. *The Female Patient* 1997;22:25-8

20. Tarazov PG, Prozorovskij KV, Ryzhkov VK. Pelvic pain syndrome caused by ovarian varices. Treatment by transcatheter embolization. *Acta Radiol* 1997;38:1023-5

21. Venbrux AC. Ovarian vein and pelvic varices in the female. In: Savader SJ, Trerotola SO, editors. *Venous interventional radiology with clinical perspectives*. New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 1996. p. 159-62

22. Villavicencio JL, Gillespie D, Durholt S, Piskoulis E, Rich NM. Diagnosis and treatment of the pelvic venous disorders: pelvic congestion and pelvic dumping syndromes. In: Raju S, Villavicencio JL, editors. *Surgical management of venous disease*. 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 462-83

Diagnosi e management perinatale delle malformazioni fetali. Dall'anomalia morfologica alla sindromologia fetale

Franco Pepe, Francesco De Luca*, Francesco Scavone, Gian Carlo Di Renzo°

UOC Ostetricia e Ginecologia, Ospedale Santo Bambino Catania

*UOC Cardiologia Pediatrica, Ospedale Ferrarotto, Catania

°SC Clinica Ostetricia e Ginecologia, Università di Perugia

Riassunto

Il 3% circa dei nati presenta un'anomalia maggiore e in circa il 5% alla fine verrà diagnosticato un difetto congenito. La causa rimane spesso sconosciuta nonostante i progressi dell'imaging fetale e della genetica molecolare. Sono comunque disponibili un numero sempre maggiore di markers per definire specifiche malformazioni o condizioni sindromiche e questo rappresenta uno dei campi in maggiore espansione in diagnosi prenatale. Lo scopo di questo studio è di descrivere il work-up perinatale finalizzato alla diagnosi delle sindromi fetali al fine di definire correttamente la prognosi fetale, effettuare una consulenza appropriata e definire il rischio di ricorrenza.

Parole chiave

Anomalia fetale
Malformazione
Sindromologia fetale
Sindromi
Ultrasuoni in ostetricia

Summary

Perinatal diagnosis and management of fetal malformations. From anomalies to fetal syndromes

Approximately 3% of newborns have a recognizable major anomaly, and at least 5% will be ultimately diagnosed with a con-

INTRODUZIONE

Le malformazioni fetali rappresentano un capitolo rilevante per prevalenza, importanza clinica e impiego di risorse economiche per il servizio sanitario nazionale. Determinanti sono la definizione eziologica, l'ottimizzazione perinatale della prognosi fetoneonatale e la quantizzazione del rischio di ricorrenza.

Nella Figura 1 è indicato il percorso diagnostico messo in atto allorché si evidenzia un'anomalia strutturale fetale o comunque vi sia il sospetto di una malformazione, pur variando i percorsi in relazione al tipo di anomalia, all'epoca di gravidanza e alla storia familiare. Un elemento centrale in diagnosi prenatale è il fattore tempo che impone l'esecuzione e, quindi, la diagnosi e la definizione della prognosi entro un lasso di tempo breve. La diagnostica per immagini e la biologia molecolare comunque rendono possibili studi di elevata qualità, ma rimane sempre notevolmente stressante per la coppia la piena comprensione dell'iter diagnostico sviluppato in tempi così brevi.

Il problema più gravoso è definire la prognosi fetale. L'ottimizzazione della prognosi nel neonato malformato non può prescindere dalla definizione della prognosi di base, dall'identificazione di indicatori di rischio per possibili complicanze fetoneonatali e dalla disponibilità di competenze e terapie efficaci, soprattutto dalla comprensione se la lesione sia isolata o inserita in un quadro sindromi-

co. Sono, quindi, particolarmente rilevanti:

- la qualità dell'assistenza prenatale e del follow-up in utero per prevenire complicanze in utero o MEF
- la prevenzione del parto pretermine e dell'ipoplasia polmonare
- la terapia in utero, nei rari casi in cui è indicata
- il management prepartale
- la sede ed il timing del parto
- la stabilizzazione del neonato critico con adeguato management postnatale.

È ormai evidente che la prognosi è necessariamente legata a fattori legati alla qualità dell'assistenza prenatale (diagnostica perinatale) offerta dal sistema sanitario, ma soprattutto alla patologia di base (gravità dell'anomalia strutturale, letalità, funzione dei vari organi e QI al follow-up, etc), sebbene la definizione di qualità di vita e di normalità stessa risenta delle notevoli limitazioni dello studio prenatale, ma anche di fattori culturali, che possono modificare significativamente il vissuto dell'anomalia e della gravità clinica per i genitori. Questo è particolarmente evidente nelle società multiculturali; altri elementi da considerare sono la qualità di vita dei paesi nei quali è posta la diagnosi e l'equo accesso alle cure mediche.

Nella definizione della severità del quadro clinico non possono non essere presi in considerazione, sempre in relazione alla storia naturale della malattia sospettata, la fase dello

genital defects. The underlying cause remains uncertain in the majority of cases, despite new advances in fetal imaging and molecular genetics. A growing number of genetic markers are available for detection of specific malformation or syndromic conditions, and this is one of the most rapidly advancing fields of prenatal diagnosis. The aim of this paper is to describe the importance of perinatal work-up to detect fetal syndrome. The objects are the accurate definition of fetal prognosis, an adequate counselling for the couple and the evaluation of recurrence.

Key word

Fetal anomalies

Malformation

Fetal syndrome

Syndrome

Obstetric ultrasound

sviluppo anatomico fetale e della fisiologia fetale in cui è posta la diagnosi, la possibile associazione con ipoplasia polmonare iatrogena (sempre più rara e pressoché eccezionale) o legata alla patologia di base od alla sindrome associata e le implicazioni dell'anomalia sul futuro sviluppo.

Da un punto di vista ecografico le malformazioni fetali possono essere classificate in relazione all'organo sede della lesione (anomalie del sistema nervoso, dell'apparato digerente, dell'apparato respiratorio, dell'apparato genitourinario, dell'apparato locomotore, cardiache, del movimento, sindromi da scompenso cardiaco, igroma-idrope, etc). Questa classificazione descrittiva ha il merito di richiamare l'attenzione sulla lesione principale, rilevando essenzialmente la sede dell'anomalia morfologica. Nulla dice sull'eziopatogenesi e soprattutto al possibile interessamento multisistemico.

Un'altra classificazione distingue l'epoca di comparsa dell'anomalia, sottolineando la particolare attenzione che l'ecografista deve porre nei tre trimestri di gravidanza nella ricerca di anomalie:

classe 1: anomalia insorta precocemente, diagnosticabile già nel primo trimestre (oloprosencefalia, anencefalia, etc)

classe 2: anomalia transitoria che può essere evidenti ad un primo esame per poi risolversi completamente o parzialmente (cisti dei plessi coroidei, NT ispessita, igroma, versamento, etc)

classe 3: anomalia che si manifesta in differenti epoche di gravidanza (idrocefalia, ernia diaframmatica, etc)

classe 4: anomalia ad insorgenza tardiva (microcefalia, coartazione aortica, etc).

Questa classificazione si correla con lo studio della fisiopatologia dello sviluppo fetale e della storia naturale della patologia.

In relazione alla severità della lesione è possibile distinguere:

tipo 1: anomalia incompatibile con la vita postnatale (anencefalia, agenesia renale bilaterale, limb body wall complex, etc)

tipo 2: anomalia con ridotta aspettativa di vita, ad esempio, gravi cardiopatie per le quali sono disponibili solo trattamenti palliativi

tipo 3: anomalia con normale sopravvivenza con handicap fisici severi (motricità, funzione renale, genitale, intestinale, etc), ma nor-

male sviluppo mentale (sindrome da regressione caudale, etc)

tipo 4: anomalia con grave e profondo ritardo mentale (HPE, del 4p)

tipo 5: anomalia compatibile con una vita normale con o senza trattamento.

IN RELAZIONE ALL'EPOCA DI DIAGNOSI DELL'ANOMALIA È POSSIBILE DISTINGUERE:

tipo A: anomalia diagnosticata in epoca precoce di gravidanza, suscettibile, se indicato di interruzione di gravidanza

tipo B: anomalia diagnosticata in epoca precoce di gravidanza, suscettibile di management in grado di migliorare la prognosi o comunque con prognosi non sfavorevole

tipo C: anomalia, anche a prognosi sfavorevole, diagnosticata in fase avanzate di gravidanza nelle quali non è possibile, per legge, l'interruzione di gravidanza. In questa evenienza è da valutare l'utilità di esami a fini diagnostici non in grado di modificare il management e, quindi, la prognosi fetale.

È tuttavia evidente che non sempre è possibile formulare queste classificazioni di ordine clinicopratico in utero, ma quando sono evidenti chiari elementi di giudizio essi possono essere dirimenti per la coppia, sebbene ciò sia possibile solo in una parte dei casi. Per di più alcune scelte determinanti, quale l'interruzione della gravidanza è peculiare di ogni normativa e non prende in considerazione la differente legislazione dei paesi europei e la mobilità sanitaria esistente, che può ampliare o restringere le scelte della coppia. Dallo studio delle malformazioni diagnosticate in 20 registri europei delle malformazioni è stato evidenziato che il 50% circa delle sindromi riconosciute con anomalia maggiore è diagnosticata in diagnosi prenatale. Sono importanti la popolazione studiata ed il tipo di anomalia strutturale rilevata:

- su 2.454 cardiopatie 479 sono sindromiche (375 con anomalie dei cromosomi e 104 senza anomalie dei cromosomi) e di queste 49 diagnosticate in epoca prenatale

- su 1.130 malformazioni renali 192 sono sindromiche (128 con anomalie dei cromosomi e 64 senza anomalie dei cromosomi) e l'84,4% di queste è diagnosticato in epoca prenatale

- su 250 malformazioni degli arti 54 sono sindromiche (16 con anomalie dei cromosomi e

38 senza anomalie dei cromosomi) e di queste il 38,9% è diagnosticato in epoca prenatale

- su 243 malformazioni dell'addome 57 sono sindromiche e di queste l'84,2% è diagnosticato in epoca prenatale
- su 349 malformazioni dell'intestino 64 sono sindromiche e di queste il 37,5% è diagnosticato in epoca prenatale
- su 188 anencefalie, tutte sindromiche, il 100% è diagnosticato in epoca prenatale
- su 290 spine bifide 18 sono sindromiche e di queste il 100% è diagnosticato in epoca prenatale.

Questi dati rilevano, quindi, come la diagnosi di sindromi in utero non sia rara nella realtà diagnostica prenatale europea attuale e sottolineano soprattutto la necessità di distinguere le anomalie strutturali isolate da quelle espressioni di sindromi, per le quali la prognosi è legata spesso alla storia naturale della sindrome stessa.

Rimane sempre, quindi, la preoccupazione maggiore che l'anomalia strutturale evidenziata possa essere espressione di una sindrome poiché in non pochi casi i segni dismorfici con definizione della diagnosi sono evidenti alla nascita o solo successivamente, anche a distanza di anni, quando la diagnosi clinica diviene ovvia. In altri casi vi è l'evidenza ecografica di un quadro sindromico, ma la diagnosi rimane inconclusiva. Teoricamente in diagnosi prenatale il rischio di sindrome non può mai essere considerato nullo anche nella negatività della storia familiare e di tutti gli esami prenatali effettuati.

DALLA DISMORFOLOGIA ALLA SINDROMOLOGIA FETALE

L'approccio pluridisciplinare in diagnosi prenatale richiede necessariamente la valutazione congiunta del caso clinico da parte dell'ecografista, dell'ostetrico, del neonatologo, del genetista (clinico e molecolare) dedicato alla diagnosi prenatale, del cardiologo perinatale, del chirurgo pediatra o di volta in volta di altro specialista. Si tratta, cioè, del lavoro multidisciplinare di un team specificamente dedicato e competente per questo segmento della patologia fetoneonatale.

In attesa del miglioramento della qualità di studio del feto, vanno valorizzati lo studio approfondito dell'anamnesi e delle note dismor-

fiche familiari, sebbene la maggior parte dei feti sindromici non nasca da famiglie con rischio noto, un adeguato studio ecografico che miri, mediante specifiche competenze e apparecchi di elevata qualità all'identificazione di tutti gli elementi utili alla diagnosi. Nella tabella 1 è indicato, ad esempio, quanto è o potrebbe essere possibile studiare o sospettare nel feto ad un approfondito e particolareggiato esame prenatale.

Queste brevi osservazioni rendono evidente come l'approccio alla malformazione fetale sia estremamente complesso e lo è molto di più in dismorfologia. Un dettagliato studio del feto eseguito con apparecchiature ecografiche di ultima generazione permette un'accurata valutazione dismorfologica del feto ed appare indispensabile la videoregistrazione con rivalutazione off-line. Nelle famiglie a rischio per una specifica sindrome questi elementi possono essere utili per la diagnosi di ricorrenza nella successiva gravidanza, ma vanno sempre presi in considerazione l'espressività fenotipica della malattia in utero (spesso rilevabili solo le forme più severe ed in fase avanzata di gravidanza), l'epoca di comparsa dei segni in utero, la predittività dei segni ecografici della lesione e la rarità e le notevoli difficoltà di tali diagnosi. Le diagnosi sono, comunque, facilitate nelle famiglie a rischio nelle quali si conosce la sindrome con certezza (compresa la conferma molecolare) e si dispone della letteratura scientifica per tempo. Se si conosce l'anomalia molecolare della sindrome è possibile confermare la diagnosi ecografica oppure effettuare la diagnosi prenatale nella gravidanza a rischio mediante prelievo di villi coriali in fase precoce di gravidanza; vanno ben conosciute comunque le correlazioni cariotipo-fenotipo o genotipo-fenotipo e l'approccio è valido nei casi in cui si conosca la mutazione familiare, la mutazione sia predittiva del fenotipo e la malattia sia di gravità tale da giustificare la diagnosi prenatale.

La sindromologia fetale comincia a rappresentare una branca consistente della diagnosi prenatale nella quale confluisce il lavoro di più specialisti. Nella tabella 2 sono indicate ad esempio le eziopatogenesi, comprese le cause sindromiche di alcune delle malformazioni fetali meno rare, nelle quali è stata posta diagnosi prenatale o perinatale di sin-

drome. Si tratta comunque spesso di case report in famiglie a rischio.

È indispensabile la creazione di centri di riferimento su territori estesi, anche regionali, affinché si possano concentrare i casi sospetti ed avviare adeguati studi. A tutt'oggi persistono numerose difficoltà nella comprensione dell'eziopatogenesi delle malformazioni fetali in relazione ai differenti pathways metabolici coinvolti, alle modificazioni epigenetiche con rilevanti interazioni tra patrimonio genetico fetale, placentare, ambientale e materno, ma indubbiamente sono stati compiuti numerosi progressi ed il nostro bagaglio culturale si è accresciuto a dismisura. La collaborazione tra più centri aumenta la possibilità di diagnosi corretta e l'acquisizione di dati singolarmente rari nei singoli centri.

CONCLUSIONI

Molte delle anomalie strutturali a carico apparente di un solo organo, non eccezionalmente si associano ad anomalie multiorgano o multistemiche con coinvolgimento di severità differente e non di rado possono essere inquadrabili in un quadro clinico ben definito o sindromico. È per questo motivo, grazie anche alla migliorata qualità della diagnostica prenatale, che è possibile dedicare particolare attenzione a ciò che oggi potrebbe essere definita sindromologia fetale con l'implementazione dei centri dedicati.

In conclusione possono essere poste alcune considerazioni conclusive:

- la diagnosi prenatale si avvale di una equipe pluridisciplinare con centri con bacino d'utenza almeno regionale per identificare casi clinici complessi e rari che richiedono specifiche e complesse competenze teoriche e laboratori attrezzati
- la rarità della malattia non sempre significa impossibilità nel porre il sospetto diagnostico; quanto maggiore è il bagaglio culturale dell'equipe perinatale ed il suo inserimento in uno specifico network lavorativo, tanto maggiore è la probabilità di porre diagnosi. In non pochi casi, nelle famiglie a rischio per malattie genetiche rare, il percorso prevede l'acquisizione di dati di imaging utili da confrontare con lo studio molecolare anche a posteriori
- posta la diagnosi ecografica, quando possibile, è indispensabile la conferma mole-

- colare, tenendo a mente la complessità di alcune diagnosi, la variabilità fenotipica e molecolare e la complessità dei pathways metabolici coinvolti
- la malformazione in utero, anche quando apparentemente isolata, va considerata come spettro di malattia, nel senso che la severità dell'anomalia strutturale può variare nel contesto della stessa anomalia e la stessa anomalia può fare parte di numerose sindromi, delle quali nel periodo fetale può rappresentare l'unica manifestazione rilevabile all'imaging
 - la lesione fetale evidenziata è parte dello spettro della sindrome diagnosticata in utero; da questo punto di vista la prognosi va espressa con cautela
 - il mancato rilievo di altre anomalie, oltre quella diagnosticata con gli ultrasuoni, non ne escludere altre di lieve entità o la successiva manifestazione; la gravità della prognosi non sempre si correla al quadro ecografico in un dato momento della gravidanza.

FIGURA 1. Modello di flow-chart nel feto con anomalia strutturale



TABELLA 1. Segni rilevabili all'imaging del feto. Alcune anomalie sono così lievi da essere valutabili solo in casi selezionati in famiglie a rischio e/o nella revisione delle registrazioni. In altri casi l'anomalia è evidente anche all'esame superficiale con apparecchiatura di bassa qualità. L'elenco delle anomalie rilevabili o sospettabili non è esaustivo, ma rende evidente l'importanza di un buon esame dismorfologico.

Idrope ed edemi generalizzati: sono dovute a più di cento cause

Cranio: presenza, assenza, dimensioni e morfologia, anomalie, dismorfismi

Anomalie strutturali maggiori. anencefalia, exencefalia, meningocele, encefalocele, idrocefalia (malattie cromosomiche, genetiche, infezioni, tumori, anticorpi antiplastrine), schizencefalia, craniosinostosi, microcefalia, macrocefalia/macrocrania, asimmetrica cranica, anomalie della conformazione (brachicefalia, dolicocefalia, scafocefalia, trigonocefalia, fronte prominente/bozze frontali prominenti, turricefalia, plagiocefalia, ritardata chiusura delle fontanelle/suture ampie, ossa wormiane), iperostosi/sclerosi ossa craniche

brachicefalia: presente in numerose sindromi

dolicocefalia: presentazione podalica

cranio a limone: l'1% dei feti normali e la maggior parte dei feti con spina bifida aperta

cranio a trifoglio (da idrocefalo associato a stenosi congenita delle suture coronale e lamboidea): acrocefalosindattilie (Crouzon, Pfeiffer, Carpenter, craniosinostosi tipo 2), sindrome camptomelica,

ridotta ecogenicità teca cranica: osteogenesis imperfecta, acondrogenesi, ipofosfatemia

deformabilità del cranio alla pressione con la sonda: osteogenesis imperfecta

Facies: rapporto neuro-splanocranico, asimmetria, appiattita, rotondeggiante, grossolana, triangolare, schisi, etc

profilo del volto: normale; anomalie fronte, radice nasale, mento, labbra e palato; tumefazioni, protrusioni dal cavo orale (lingua, masse, etc)

schisi facciale atipica, schisi facciale tipica schisi mediana o cleft face syndrome

anomalie strutturali maggiori: schisi, tumefazioni, ipoplasie, craniosinostosi, displasie ossee

Cervello: tappe dello sviluppo embriologiche, scissure e circonvoluzioni, strutture della linea mediana

anomalie strutturali maggiori: idranencefalia, megaencefalia, ventricolomegalia, anomalie della linea mediana, ACC, lipomi, anomalie della fossa cranica posteriore, brain disruption, anomalie dello sviluppo delle circonvoluzioni, schizencefalia, etc

Orecchi: forma, dimensioni, micro-anotia, appendici preauricolari; padiglioni auricolari a basso impianto, inclinati all'indietro, grandi/prominenti; altre anomalie dei padiglioni auricolari e dell'orecchio

orecchi: cromosomopatie, anomalie genetiche; in alcune sindromi esistono dismorfismi specifici degli orecchi

depressioni, appendici cutanee o cisti preauricolari: sindromi cromosomiche (trisomia 13, 18, 21 e t (11;22) e genetiche (sindromi di Fraser, Goldenhar, Nager, Treacher-Collin, brachiootorenale, sindrome dell'occhio del gatto, spettro fenotipico facioauricolovertebrale), ma presenti anche in soggetti normali

Orbite: numero, sede, sviluppo, dimensioni, distanza interoculare, cristallino, palpebre, arteria ialoidea

fenotipo: descritte anomalie con arcate sopraciliari prominenti, ipoplasiche, altre anomalie

ciclopia: malattie genetiche associate ad HPE

ipotelorismo: anomalie cromosomiche (trisomia 13, trisomia 13 ad anello, altre anomalie cromosomiche) e genetiche (sindrome di Meckel-Gruber), anomalie strutturali a carico del SNC (HPE)

ipertelorismo anomalie cerebrali, cromosomiche (es trisomia 13) e genetiche (sindrome di Neu-Laxova, Apert, Opitz; displasia frontonasale, sindrome della schisi facciale mediana)

Globo oculare: presenza/assenza, numero, dimensioni, prominenti/esoftalmo, infossati/enoftalmo, micro-anoftalmia, cristallino (presenza, assenza, cataratta), anomalie della retina; mobilità dell'occhio

anoftalmia, microoftalmia, criptoftalmo: sindrome di Fraser, del interstiziale 3q27 (ove mappa il gene SOX2), infezioni

Retina: sindrome di Walker-Warburg

Palpebre: rime palpebrali (movimenti di apertura e chiusura), anomalie dell'apparato lacrimale (tumefazioni)

Cataratta: infezione fetale (toxoplasmosi, CMV, rosolia), cromosomopatie (trisomia 13, sindrome di Down), sindromi (SAF, COFS, Neu-Laxova, Lowe; WAGR, condrodysplasia punctata, Beckwith-Wiedeman, Walker-Warburg, Warburg, MICRO, Mart-solf, CAHMR, Larsen)

Ghiandola lacrimale: dacriocistoceli; altre tumefazioni

Naso: assenza dell'osso nasale in trisomia 21, 18, displasia frontonasale; schisi; naso prominente/grande, a pappagallo, piccolo/corto, largo, sottile, sella nasale ipoplasica/infossata, sporgente, narici anteverse, anomalie delle ali del naso
Ponte nasale depresso/ipoplasia mascellare: cromosomopatia (del 11q o sindrome di Jacobsen, trisomia 21, trisomia 13), anomalie strutturali (HPE), sindromi (CHARGE, acondroplasia, condrodiplosia punctata, displasia tanatofora, displasia camptomelica, atelosteogenesi, Apert, Carpenter, Pfeiffer, disostosi cleidocranica, Larsen, Freeman-Sheldon)

Atresia delle coane: sindromi (CHARGE, Larsen, Treacher-Collins, Marshall-Smith, Walker-Warburg), cromosomopatie (trisomia 18)

Labbra: fini, grosse/carnose, fossette labiali, schisi tipica, mediana ed atipica, tumefazioni

Filtro: lungo, corto, ipoplasico, prominente, largo, anomalie nel contesto di schisi, tumefazioni

Bocca: piccola, grande, asimmetrica, labioschisi con o senza palatoschisi, palatoschisi, macroglossia, anomalie della lingua, tumori del cavo orale; microstomia e macrosomia presenti in specifiche sindromi

Lingua: macroglossia nelle sindrome di Beckwith-Wiedeman e Perlman, ipotiroidismo, linfangioma linguale
Mascella: ipoplasia mascellare, trisomia 21, acrocefalosindatilia, dopo assunzione di farmaci (acido valproico, carbamazepina, idantoina) o di sostanze voluttuarie (alcol), sindrome di Binder ed in specifici quadri sindromici

Mandibola: rapporto con neurocranio, apertura e chiusura, micrognazia e/o retrognazia, agnazia-otocefalia, prognatismo, schisissequenza di Pierre-Robin: ipoplasia mandibolare con schisi palatina
neuroartrogriposi: la paralisi del muscolo massetere riduce o impedisce del tutto i movimenti temporomandibolari con secondaria micrognazia e nei casi più gravi microstomia
micrognazia: vedi tabella successiva

Collo: nuchal translucency ispessita nel primo trimestre e plica nucale nel secondo, igromi, cisti laterali del collo, collo corto, pterigio del collo, forma anomala per presenza di anomalie delle vertebre (iniencefalia, sindrome di Klippel-Feil), teratomi o linfangioni del collo, gozzo tiroideo
anomalie strutturali maggiori: schisi, angiomi, igromi, teratomi

ANOMALIE DEL SISTEMA RESPIRATORIO

torace/colonna/bacino: anomalie vertebre, clavicole, scapole; pectum excavatum/carenato; torace stretto, tronco corto, anomalie di curvatura della colonna vertebrale, anomalie forma, numero ed ecostruttura delle coste, anomalie delle vertebre, anomalie del bacino; nel torace displasico aspetto del profilo toracoaddominale a tappo di champagne per la sproporzione tra i due diametri (grave displasia ossea ed ipoplasia polmonare); a granchio nella sindrome di Jarcho-Levin, etc; coste corte, spesse, sottili, a rosario, difettose, svasate, irregolari nel numero, nella disposizione e nell'orientamento e nell'articolazione con le vertebre; deficit di mineralizzazione anche localizzati

anomalie strutturali maggiori: ernia diaframmatica, CAM e sequestro, tumori, ipoplasia, idrotorace isolato, pentologia di Cantrell

schisi del torace: sindromi della linea mediana e schisi sternale isolata; ectopia cordis

tumefazioni toraciche: linfangiomi isolati od espressione della sindrome di Klippel-Trenaunay-Weber; igromi, tumori, depressioni gabbia toracica

deformità colonna vertebrale: anomalie del SNC, emivertebre, agenesia vertebre (sindrome da regressione caudale), disorganizzazione vertebrale, difetti di mineralizzazione anche localizzati, anomali rapporti con altri segmenti ossei, azioni muscolari asimmetriche (LBWC); la statica e la morfologia della colonna vertebrale possono essere alterate da emivertebre o vertebre a farfalla per fallimento della formazione dei segmenti vertebrali con conseguente cifosi, scoliosi, lordosi, accorciamento della colonna

emivertebre e/o fusione vertebrale: associazione VATER, sindrome da regressione caudale, sindrome di Noonan, estrofia cloacale, sindrome di Marfan, sindrome o malformazione di Klippel-Feil:

scapola e clavicola: agenesia od ipoplasia in specifiche sindromi

muscoli pettorali: ipo-aplasia nell'anomalia di Poland

timo: cardiopatie troncoconali, infezioni, sindromi genetiche

◀ Anomalie cardiovascolari: isolate, associate ad altre anomalie, sindromiche, da teratogeni

Apparato digerente: sviluppo embriologico, studio dell'anatomia e morfologia dei vari distretti; peristalsi, tumefazioni, quantità del liquido amniotico, colecisti, via biliare
 anomalie strutturali maggiori: labiopalatoschisi, onfalocele, gastroschisi, schisi parete, tumefazioni, atresia anale, epato/splenomegalia, ascite, ostruzione intestinale, altre anomalie intestinali; altre malformazioni

Genitali: ipospadia/genitali ambigui, criptorchidismo, ipertrofia del clitoride, altre anomalie

Apparato scheletrico

arti: agenesia o difetto di formazione trasversale, deficit differenziazione distale, duplicazione, sovracrescita, ridotto sviluppo, amelia, acheiria, focomelia

dita: forma, numero (duplicità) e dimensioni (lunghezza, aracnodattilia), morfologia, fragilità/frattura, incurvamento, ecostruttura; clinodattilia o camptodattilia e/ o sovrapposizione delle dita; mano chiusa a pugno; polidattilia, sindattilia, combinazione polidattilia-sindattilia, ectrodattilia; ipo-aplasia di tipo preassiale, ipo-aplasia di tipo trasverso/postassiale/intercalare, anomalie delle epifisi, anomalie delle ossa del carpo, polidattilia, sindattilia, alluce/pollice grande o doppio, anomalie di posizione pollice/alluce

piedi: torti, piede a dondolo, piede talo, deformità a sandalo, sirenomelia

bacino: anomalie di forma, calcificazioni, ecogenicità, distanza tra ali ischiatiche, etc

deformità posizionali degli arti o contratture articolari multiple: da 1) anomalia di sviluppo, 2) deficit della muscolatura striata, 3) malattie genetiche (displasia diastrofica, condrodiplosia punctata rizomelica, etc), 4) cromosomopatie, 5) anomale della pressione intrauterina (oligoamnios, anidramnios, tumori uterini, briglie amniotiche) causa di deformazione, 6) forme isolate ad eziologia sconosciuta. Multiple deformità in flessione di arti, mani e piedi con immobilità degli arti; possibile lo sviluppo di pieghe cutanee (pterigi) a livello delle articolazioni; le cause neonatali più frequenti sono le malattie del SNC, (55%), le malattie del connettivo (11%), le malattie neuromuscolari periferiche (8%), le malformazioni scheletriche od altre anomalie (19%); la frequenza della cause in utero può essere differente

articolazioni: contratture multiple/rigidità/limitazioni movimenti articolari, pterigi articolari, lussazioni articolari, anomalie del gomito, piede torto

Muscoli scheletrici: riduzione/assenza di movimenti, ipotrofia spiccata, movimenti a scatti

Reni e della via urinaria: sviluppo e funzione dei reni, vescica

anomalie strutturali maggiori: agenesia, ipoplasia, duplicazioni, rene a ferro di cavallo, altre anomalie renali; idronefrosi e dilatazione via urinaria, megavesica, schisi parete addominale, cisti renali, tumori

sexo: maschile, femminile, anatomicamente indeterminabile, ambiguità dei genitali, sex reversal; criptorchidismo (isolato, associato ad altre malformazioni o cromosomopatie o sindromi genetiche); scroto a scialle

Cute ed annessi: neoplasie che alterano la regolarità del piano cutaneo o dermopatie restrittive con tipico aspetto della cute (anche nelle labbra); igroma, linfangioma, tumefazioni dei tessuti molli nella sindrome di Klippel-Trenaunay-Weber o nella sindrome PROTEUS

MAF: (corpo in toto, arti, gabbia toracica): ridotti nella SAF, in presenza di pliche cutanee, sindrome da regressione caudale o nella sofferenza fetale; a scatti

anomalie di posizione del corpo fetale: estremità inferiori a rana nella sindrome da regressione caudale; aderenza alla placenta, ipomobilità e scoliosi grave della colonna vertebrale nel limb body wall, complex; ipomobilità arti inferiori se gravi lesioni al midollo (DTN); sirenomelia con aspetto anomalo estremo caudale del corpo

TABELLA 2. L'eziologia delle anomalie strutturali fetali è molteplice, riconoscendo causa ambientali e genetiche; l'associazione con anomalie cromosomiche e sindromi genetiche varia notevolmente in relazione al tipo di anomalia strutturale, ma anche della qualità dello studio effettuato, come dimostrato, ad esempio, nell'ernia diaframmatica nella quale la frequenza di anomalie cromosomiche valutate mediante aCGH è elevata

microcefalia	ACC	ernia diaframmatica	atresia esofagea	schisi facciale	micrognazia
trisomia 13	trisomia 13	dupl 1q25q31.2	triploidia	trisomia 10	trisomia 10
trisomia 18	trisomia 8	del 1q41-q42	trisomia 18	trisomia 13	trisomia 18
trisomia 22	trisomia 8 a mosaico	del o dupl 2q37	trisomia 2	trisomia 18	trisomia 9
del 4p	del 4p	del 3q22	del 22q11	trisomia 22	del 11q
del 59	45XO	del 4p16	del 17q22q23.3	trisomia 9	del 4p
del 18p	XXXXY	del 6p25	del 13q	del 4p	trisomia 13
del 18q	del Xp22.3, Xp13-q2	del 6q25.3	del 13q32	HPE	triploidia
monosomia 21	del 6p23	del 8p23.1		sirenomelia	49,XXXXY
disruption cerebrale			du 8(p21p23)	dupl 8p21-p23.1	isotretinoina
alcol		du11(q23qter)	del 11p13		fenilchetonuria
radiazioni		trisomia par 7p	del 8q22q23		materna
idantoina			dupl 12p		
amminopterina			dupl 15q26		
rosolia			dupl 22qter-q11		
CMV					
Toxoplasma					
Herpes					

secondaria a cardiopatie con ridotto afflusso cerebrale secondaria a schisi cranica primaria

Coffin-Siris	Miller-Dieker	Pierre Robin	CHARGE	CHARGE	acondrogenesi
Rubistein Taybi	Rubistein Taybi	Rubistein Taybi	Potter	MURCS	displasia
Neu-Laxova	Zellweger	Cantrell	associazione-schisi	SLO	camptomelica
Langer-Giedon		Meckel-Gruber	PAGO	Walker-Warburg	atelosteogenesi
Cockayne	acro-callosa	Goldenhar	VATER-VACTERL	van der Woude	Roberts
CAMAK	Fryns	Fryns	Down	Fryns	displasia
CAMFAK	Walker-Warburg	Klippel-Feil	Feingold	Gorlin	tanatofora
Menkes	Marden-Walker	Beckwith-Wiedeman	Fanconi	Roberts	ipoplasia
Bloom	Andermann	Pallister-Killian	AEG	Goldenhar,	femorale
Dubowitz	Neu-Laxova	Cornelia de Lange	atresie multiple	Pierre Robin	faccia
Roberts	Joubert	Stickler	intestinali	Pena-Shokeir	insolita
Johanson-Blizzard	idrocefalo X-linked recessivo	Matthew-Woods		orofacioidigitale II	displasia
Cornelia de Lange	deficit piruvato-deidrogenasi	disostosi		Nager	camptomelica
MICRO	- X-linked		spondilo-costale	Cantrell	displasia
Galloway	Varadi-Papp			Meckel-Gruber	diastrofica
Fanconi	FG			Marfan	costa corta-
Paine	Toriello-Carey			Neu-Laxova	polidattilia
	Lissencefalia-X-linked			pterigi multipli	ipoplasia
	Aicardi			idroletale	Nager
				artrogriposi	Treacher-
				Larsen	Collin
				EEC	Freeman-
				Klippel-Feil	Sheldon
				costa corta-	Fryns
				polidattilia	Goldenhar
				displasia diastrofica	Dubowitz
				camptomelica	Seckel
				ipoplasia-femore	otopalato-
				-faccia inusuale	digitale II
				banda amniotica	cerebro-
				Crouzon	costo-
					mandibolare
					Carpenter
					Crouzon
					Cornelia-de
					Lange
					Joubert
					Meckel-Gruber
					SAF
					pterigi multipli
					Neu-Laxova
					Pena-Shokeir
					SLOS
					Shprintzen
					genito-
					palatocardiaca
					Larsen
					CHARGE
					spettro
					fenotipico
					oromandibolo-
					ipoplasia arti
					rene polistico
					autosomico
					recessivo

BIBLIOGRAFIA

I riferimenti bibliografici sono disponibili su

Franco Pepe, Francesco De Luca, Francesco Scavone, Giancarlo Di Renzo: DIAGNOSI E MANAGEMENT PERINATALE DELLE MALFORMAZIONI FETALI, Verduci Editore, Roma, 2009

Norme per gli autori

I dattiloscritti vanno inviati al Comitato Editoriale AOGOI - presso la Segreteria Nazionale, via Giuseppe Abamonti 1, 20129 Milano - all'attenzione della Direzione scientifica. Non si risponde della reperibilità di materiale inviato o consegnato ad altri indirizzi. L'accettazione dei lavori è subordinata al parere dei referees appositamente incaricati. La lettera di accompagnamento deve indicare un autore come corrispondente, recapito telefonico e postale.

Si prega di allegare:

1. titolo del lavoro (in italiano e in inglese)
2. nomi e cognomi degli autori per esteso
3. enti o istituti di appartenenza
4. riassunto in italiano
5. parole chiave in italiano
6. summary in inglese
7. key words in inglese
8. bibliografia completa in tutte le voci (vedi sotto)
9. se ci sono tabelle devono essere complete di titolo, eventuale legenda e riferimento nel testo
10. se ci sono illustrazioni devono essere complete di didascalia, eventuale legenda e riferimento nel testo.

La chiarezza e la completezza nella presentazione dei testi, tabelle e figure contribuisce ad accelerare i tempi di pubblicazione. L'autore è responsabile di tutto il contenuto del testo pubblicato. Si dà per scontato che i testi proposti non siano già stati pubblicati, né simultaneamente inviati ad altri editori.

Testi. Il testo deve essere redatto in italiano e non deve superare il massimo di 15/18 cartelle dattiloscritte.

Le cartelle (60 battute per 30 righe ciascuna) devono essere scritte su una sola facciata a doppia interlinea, con adeguato margine ai lati per annotazioni redazionali, e senza correzioni a mano.

Le unità di misura devono essere riferite secondo il sistema internazionale.

Informatizzazione. I lavori devono essere inviati su supporto informatico accompagnati comunque dalla stampata su carta per la prima verifica.

Non saranno accettati lavori privi di supporto informatizzato.

Titoli. Si raccomanda che i titoli siano brevi e specifici; la redazione si riserva il diritto di apportare eventuali modifiche che si rendessero necessarie previa comunicazione all'autore.

Riassunti. Ogni lavoro deve essere accompagnato da un riassunto in italiano di lunghezza compresa tra le 10 e le 15 righe dattiloscritte.

Bibliografia. La bibliografia deve essere numerata consecutivamente nel testo.

Alla fine del lavoro le citazioni verranno elencate nell'ordine numerico in cui sono state citate e quindi non in ordine alfabetico.

Per ogni citazione di articoli si indicheranno nell'ordine: cognome e iniziale del nome di tutti gli autori, titolo dell'articolo, nome della pubblicazione abbreviata secondo l'Index Medicus, anno di pubblicazione, numero del volume, numero della prima e dell'ultima pagina dell'articolo.

Per ogni citazione di libri, cognomi e iniziali di tutti gli autori, titolo del libro, numero di pagina nel caso di specifico riferimento, edizione oltre alla prima cognomi e iniziali dei curatori dell'opera, casa editrice, città e anno di pubblicazione.

Illustrazioni e tabelle. Le illustrazioni possono essere inviate come foto in bianco e nero o a colori su carta lucida, come diapositive in b/n o a colori, o come disegni originali in inchiostro di china nel formato massimo 18 x 24 cm.

Sul retro in alto a matita vanno indicati il nome dell'autore e il numero dell'illustrazione (qualora siano più di una). Ogni tabella deve avere un titolo ed essere chiaramente autoesplicativa (se vengono riportate delle sigle deve esserci una legenda esauriente).

Il numero delle illustrazioni e delle tabelle deve essere finalizzato alla comprensione del testo; in ogni caso la redazione si riserva il diritto di modificare o eliminare le figure che non soddisfino questa esigenza.

Bozze. Solo su specifica richiesta contemporanea all'invio del materiale o per decisione insindacabile della direzione scientifica, le bozze saranno inviate all'autore indicato come corrispondente e dovranno essere restituite entro 10 giorni dal ricevimento. Sono accettate solo correzioni di carattere tipografico.

Uniformità. La redazione si riserva il diritto di apportare al testo modifiche di uniformità redazionale.

Importante. I lavori inviati, una volta accettati per la pubblicazione, non verranno restituiti agli autori.

I lavori che non rispettano le norme qui indicate saranno rinviati agli autori.