

# INDICE

## ***CAPITOLO I:***

Ruolo dell'ecografia nella diagnosi prenatale del ritardo di crescita..... pag. 4

## ***CAPITOLO II:***

La flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale nel monitoraggio dell'insufficienza placentare: correlazioni immunoistochimiche.....pag. 12

## ***CAPITOLO III:***

Valutazione delle proteine non collageniche della matrice e flussimetria Doppler ombelicale nel ritardo di crescita intrauterino

- Premesse.....pag. 20
- Obiettivi dello studio.....pag. 23
- Pazienti e metodi.....pag. 24
- Risultati.....pag. 29
- Discussione .....pag. 31

## ***CAPITOLO IV:***

Importanza dell'approccio multidisciplinare nello studio dell'etiogenesi dello IUGR e prospettive .....pag. 38

***TABELLE E FIGURE*** .....pag. 43

***BIBLIOGRAFIA*** .....pag. 48

## ***Capitolo I***

### ***Ruolo dell'ecografia nella diagnosi prenatale del ritardo di crescita.***

L'ecografia è una metodica non invasiva che consente uno studio accurato e ripetibile dello sviluppo embriofetale e degli annessi.

L'avvento del Doppler e del color Doppler ha fornito importanti elementi per la comprensione della circolazione utero-placentare e feto-placentare.

Gli organi fetali durante l'accrescimento sono soggetti a modifiche legate al momento evolutivo che richiedono un approccio dinamico allo studio dell'anatomia fetale, dello sviluppo e crescita del feto stesso.

La valutazione morfologica dell'anatomia fetale eseguita nel secondo trimestre tra la 18° e la 22° settimana, consente di visualizzare buona parte delle anomalie congenite maggiori (1).

La valutazione dell'accrescimento fetale è un'altra delle principali applicazioni dell'ecografia nella pratica ostetrica. Molti paesi hanno introdotto l'obbligo ad eseguire un esame ecografico all'inizio del terzo trimestre come screening delle patologie della crescita fetale sia in eccesso che in difetto. Numerosi studi hanno evidenziato che la misurazione della circonferenza addominale offre, rispetto alle altre variabili biometriche fetali, una migliore accuratezza nella stima del peso fetale.

Il ritardo di crescita intrauterina (IUGR) complica il 5-10 % delle gravidanze ed è un fattore altamente predittivo di mortalità e morbilità perinatale se non diagnosticato correttamente e precocemente (2).

La definizione, nella letteratura medica, dei bambini sotto peso risale al 1919, quando fu detto che tutti i nuovi nati con peso < di 2,500 kg potevano essere classificati come prematuri. Dopo il 1961 l'Organizzazione Mondiale della Salute (WHO) riconobbe che molti neonati, definiti come prematuri, non erano nati prima ma erano

semplicemente dei “ nati sotto peso”. Secondo la classificazione (WHO) sono definiti sotto peso i nati con un peso < di 2,500 kg o sotto il 10° percentile per l'epoca gestazionale. I nati sotto peso includono due condizioni patologiche ed una condizione normale. La condizione normale si riferisce al neonato sano ma costituzionalmente piccolo. Le condizioni patologiche includono il parto pre-termine ed il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) (3).

Per IUGR si intende un deficit nello sviluppo del potenziale genetico di accrescimento.

Secondo la definizione elaborata dal gruppo di studio SIGO “Nuove Tecnologie Biofisiche”, in presenza di una corretta datazione della gravidanza, documentata da un esame ecografico eseguito entro la 22° settimana di gestazione, il ritardo di crescita viene classificato come lieve se la circonferenza addominale (CA) è compresa tra il 5° e il 10°

percentile, severo se supera di 2 DS, pari al 2,5° percentile, i valori biometrici per l'epoca.

Una riduzione di almeno 40 percentili della circonferenza addominale, in studi longitudinali, sarà indicativa di rallentata crescita.

Le molteplici cause di IUGR sono in genere suddivise in cause intrinseche al feto o alla placenta, o in cause estrinseche, quali fattori materni che agiscono primariamente sul feto, sulla placenta o su entrambi.

Il ritardo di crescita intrauterina può avvenire con due modalità. Si definisce affetto da IUGR di tipo I o simmetrico il feto con ridotto potenziale di crescita causato da infezioni congenite, anomalie genetiche, uso di farmaci in gravidanza, ed in genere si manifesta nelle fasi più precoci della gravidanza; è caratterizzato da una riduzione armonica della crescita dei vari organi fetali senza sproporzioni. Lo IUGR di tipo II o asimmetrico è caratterizzato da un feto la cui crescita, potenzialmente

normale, è invece rallentata per anomalie uteroplacentari, malnutrizione materna, malattie materne o gravidanze multiple, e si manifesta quando la causa insorge, in genere, dopo la XXVI settimana. In questo tipo di IUGR si verifica classicamente una sproporzione di dimensioni tra il cervello, la cui crescita rimane invariata spesso fino alle fasi terminali, e gli organi addominali, maggiormente soggetti alla situazione di deprivazione nutrizionale che sovente è alla base di questo disturbo della crescita fetale (4).

Molte delle cause materne di IUGR sono dovute ad un disturbo della funzionalità placentare, cosiddetta “insufficienza placentare”. Le più importanti cause di tale insufficienza sono le vasculopatie materne e la sindrome gestosica nelle sue varie espressioni, che causano tardivamente una alterazione dei meccanismi di placentazione (5). Fisiologicamente, invece, l’invasione trofoblastica porta allo sviluppo di un letto vascolare a bassa resistenza ed alta capacità tale da garantire il fisiologico aumento del

flusso ematico uteroplacentare che si ha con l'avanzare della gravidanza. Molti studi hanno evidenziato nelle pazienti affette da gestosi pre-eclamptica con ipertensione e/o danno epatorenale, una assente o inadeguata invasione trofoblastica delle arterie spirali materne. Al contrario il persistere di un' alta resistenza vascolare uterina compromette gli scambi materno- fetali di sostanze nutritive prima, e d'ossigeno poi, determinando così l'instaurarsi di un IUGR (5,6).

Lo studio della velocimetria Doppler in tempo reale, abbinata alla tecnica ecografica, ha consentito una più agevole diagnosi differenziale tra quei feti piccoli, perché geneticamente tali e quelli piccoli per carenze di substrato e quindi più esposti all'ipossia e all'asfissia perinatale.

La velocimetria Doppler dell'arteria ombelicale è espressione della resistenza del letto placentare (7). La velocimetria Doppler dei vasi fetali, consente, invece di approfondire quei meccanismi di adattamento della circolazione fetale, in particolare, del circolo cerebrale in risposta

all'insulto ipossico cronico endouterino che si verifica nei casi di insufficienza placentare severa (8).

La flussimetria Doppler, consente quindi di identificare in modo non invasivo le deviazioni dai normali adattamenti emodinamici nei distretti utero-placentare, feto-placentare e fetale attraverso lo studio del flusso delle arterie uterina, ombelicale e cerebrale media. Gli indici flussimetrici rispecchiano le caratteristiche del distretto vascolare a valle del punto di misurazione, quindi lo studio Doppler flussimetrico dell'arteria ombelicale è un indice delle resistenze ombelico-placentari (9-10).

Le onde velocimetriche ottenute, producono una caratteristica immagine sullo schermo, dette onde Doppler. Queste onde possono essere valutate mediante l'uso di indici velocimetrici che rispondono ad un rapporto tra velocità sistolica e velocità diastolica. Gli indici più comunemente utilizzati in letteratura scientifica ostetrico-ginecologica sono: rapporto

Sistole/Diastole (SD), Indice di Resistenza (RI) e indice di Pulsatilità (PI).

SD: velocità di sistole/velocità di diastole

RI: (velocità di sistole – velocità di diastole)/ velocità di sistole

PI: (velocità di sistole – velocità di diastole)/velocità media.

L'indice più utilizzato è l'indice di pulsatilità che include nel calcolo anche la velocità media, identificando meglio la morfologia dell'onda velocimetrica. Esistono infatti numerose onde Doppler con uguale velocità sistolica e diastolica ma con forma differente. Queste onde avranno gli stessi valori di S/D ed RI ma un differente PI.

Tutte le apparecchiature ecoDoppler, di recente costruzione, hanno il software adatto per il calcolo automatico o semiautomatico dei tre indici

esposti. Nelle gravidanze fisiologiche, le velocità telediastoliche a livello dell'arteria ombelicale, normalmente presenti dalla XV settimana in poi, aumentano progressivamente con l'avanzare dell'epoca gestazionale; perciò gli indici Doppler (PI, S/D e RI) risultano diminuiti con il progredire della gestazione. Questi cambiamenti degli indici Doppler sono considerati espressione della diminuzione fisiologica dell'impedenza vascolare placentare, conseguente all'apertura progressiva ed alla confluenza delle piccole arterie muscolari nel compartimento dei villi terziari. Nei casi di difetto di crescita fetale legato ad alterazioni placentari clinicamente intese come insufficienza placentare, gli indici velocimetrici appaiono elevati e spesso correlabili con esiti perinatali sfavorevoli. Il PI ombelicale abnormemente elevato costituisce un eccellente indicatore di sfavorevole prognosi perinatale. Alterazioni estreme dell'onda velocimetrica sono rappresentate dalla scomparsa e dall'inversione della diastole (ARED) (4-11).

Steel, nel 1990 su Lancet, pubblicava uno studio effettuato su 1000 gravide sottoposte a flussimetria ombelicale tra la 18a e la 24a settimana di gestazione. La sensibilità del test nel predire l'ipertensione materna associata alla proteinuria o all'IUGR è stata rispettivamente del 63% e del 100% (12).

Numerosi studi osservazionali hanno confermato l'associazione tra riduzione del flusso in diastole dell'arteria ombelicale e complicanze della gravidanza, nonché un aumento della mortalità perinatale.

Già nel 1995 Alfineric pubblicava una metanalisi degli studi effettuati fino ad allora da cui, attraverso l'esame di trials clinici controllati, risultava un rischio di mortalità perinatale del 38 per cento inferiore nelle gravidanze ad alto rischio nelle quali la velocimetria Doppler ombelicale orientava la scelta clinica rispetto ai controlli (13).

La flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale non è tanto importante nella diagnosi del ritardo di crescita, dove è indubbio il ruolo dell'ecografia, ma nelle capacità di individuare nell'ambito di quei feti piccoli per l'età gestazionale quelli a maggior rischio di ipossia.

## *Capitolo II*

### *La flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale nel monitoraggio dell'insufficienza placentare: correlazioni immuno-istochimiche.*

Oggi la flussimetria ombelicale sembra essere un buon parametro di valutazione delle resistenze placentari (10,12); è pur vero, però, che per avere delle alterazioni velocimetriche il danno del letto vascolare placentare deve essere superiore al 30-40% (5,14). La placenta umana è di tipo emocoriale. Ciò significa che ci sono stretti rapporti tra sangue fetale e sangue materno, pur rimanendo separate le due circolazioni.

Il versante fetale della placenta è delimitato dalle placche corioniche, mentre il versante materno è delimitato dalla decidua basale, parte integrante della placenta. Vi è una “zona giunzionale” a livello della quale il trofoblasto e le cellule deciduali si mescolano.

Questa zona giunzionale è formata da cellule deciduali, cellule sinciziali giganti ed è ricca di materiale amorfo extracellulare.

La superficie materna è lobulata in quanto corti setti deciduali separano i grandi cotiledoni e al margine placentare si incontrano la lamina coriale e le membrane fetali.

La struttura che costituisce microscopicamente la placenta è il villo che è composto da uno stroma collagenico contenente capillari che sporgono dalla superficie del villo stesso portando il sangue fetale a diretto contatto con il flusso ematico materno da cui è separato da un sottile strato endoteliale dei capillari fetali e dal citoplasma delle cellule sinciziali. I capillari placentari sono avvolti dalla matrice extracellulare (6).

La matrice extracellulare ha un ruolo chiave nell'architettura stromale e le cellule mesenchimali locali contribuiscono in maniera significativa alla sua produzione.

Nello stroma di villi coriali sono state ampiamente descritte componenti collageniche e non della matrice stessa. Queste macromolecole partecipano non solo al rimodellamento placentare ma anche ai processi induttivi l'angiogenesi dell'albero vascolare placentare.

Numerosi studi di istochimica ed immunoistochimica placentare dimostrano che le profonde alterazioni morfologiche osservate nelle placentate dei feti affetti da ritardo di crescita, sono dovute sostanzialmente a cambiamenti della matrice extracellulare (7).

Lo stroma villosa della placenta supporta l'invasione trofoblastica e rappresenta l'ambiente in cui si sviluppa la vascolarizzazione placentare; la matrice extracellulare (MEC) gioca quindi un ruolo chiave nell'architettura stromale.

Diversi studi hanno sottolineato come alterazioni della flussimetria Doppler ombelicale nei feti IUGR, riflettano anomalie strutturali a carico della MEC placentare, per cui è opportuno un'analisi delle sue componenti.

La MEC forma una parte rilevante del volume di qualsiasi tessuto ed è costituita da macromolecole esterne alle cellule, a cui fornisce il substrato su cui possono aderire, migrare, proliferare, influenzandone forma e funzione. Tali fenomeni così importanti per lo sviluppo fetale da farci sospettare gravi alterazioni di queste proteine in quelle gravidanze in cui la crescita del feto subisce una evidente diminuzione.

Tre gruppi di macromolecole sono fisicamente associate a formare la MEC:

1. proteine fibrose strutturali come l'elastina e il collagene, indispensabili per l'intelaiatura extracellulare dei tessuti, e responsabili della maggiore o minore rigidità degli stessi ; esse sono le componenti collageniche tissutali.

2. glicoproteine adesive, tra cui fibronectina e laminina che hanno il compito di legare i componenti della MEC l'uno all'altro e alle cellule.

La fibronectina è prodotta da fibroblasti, monociti, cellule endoteliali e altri tipi cellulari e si trova associata alle superfici cellulari, alle membrane basali e alle matrici pericellulari; è coinvolta direttamente nella adesione, nello "spreading" (processo con cui la cellula si appiattisce e aderisce attivamente al substrato) e nella migrazione cellulare; aumenta, inoltre, la sensibilità di alcuni tipi cellulari, come le cellule endoteliali dei capillari, agli effetti proliferativi dei fattori di crescita. La laminina è la glicoproteina più abbondante nelle membrane basali (MB), attraversa la lamina basale legando da un lato recettori specifici sulla superficie cellulare, e dall'altro componenti della matrice. Modula l'adesione, la crescita, la sopravvivenza, la morfologia, il differenziamento e la motilità di diversi tipi cellulari ed è coinvolta nei meccanismi iniziali dell'angiogenesi.

3. un gel costituito da proteoglicani e da ialuronico.

Una nuova classe di proteine che non hanno funzioni strutturali nella MEC, ma interagiscono con proteine della matrice, con recettori della superficie cellulare o con altre molecole (come fattori di crescita, citochine o proteasi) che a loro volta interagiscono con la superficie cellulare, sembrano di interesse nello studio delle modifiche della matrice nelle placente compromesse da gravi alterazioni. Di questo gruppo di molecole fa parte la tenascina, proteina multimerica coinvolta nella morfogenesi e nella modulazione dell'adesione cellulare, sia in senso inibitorio che induttivo. Essa aumenta nei tessuti che vanno incontro a rimodellamento e morfogenesi ed entra in gioco anche nelle reazioni immunologiche che coinvolgono l'embrione al momento dell'impianto.

Le molecole della MEC si assemblano in due tipi di strutture: stroma interstiziale e MB (15-16).

A livello placentare il collagene è presente nello stroma villosa e nelle MB dei vasi e del trofoblasto, per tutta la durata della gravidanza.

La laminina è espressa nel mesenchima villosa ed è confinata nel 1° trimestre a livello della MB del trofoblasto e dei vasi; a termine aumenta la sua concentrazione estendendosi anche allo stroma.

La fibronectina è abbondante sia nel 1° trimestre che a termine della gravidanza, in tutto lo stroma, inclusa la parete dei vasi e le aree al di sotto della membrana basale trofoblastica.

La tenascina è espressa soprattutto nel 1° trimestre a livello dello stroma. A termine diminuisce, ed è per lo più espressa vicino ai depositi di fibrina coprendo o sostituendo il trofoblasto villosa dei villi primari (7, 17).

Vari studi hanno sottolineato il ruolo della MEC nella regolazione della circolazione ombelicale e la presenza di anomalie istologiche ed istochimiche placentari in tutti i feti affetti da IUGR con alterazioni della flussimetria Doppler. In particolare sono state studiate le componenti non collageniche ed il dato più rilevante è il riscontro nei feti IUGR, sia di

madri pre-eclamptiche che non pre-eclamptiche, della maggiore sostituzione del collagene di tipo III con il collagene di tipo I (18).

Il collagene di tipo III è una delle proteine strutturali più importanti della MEC placentare in gravidanze normali. Il collagene di tipo I è una molecola tipicamente rappresentativa dell'età adulta; la sua presenza spiegherebbe l'aumento della rigidità della MEC e conseguentemente determinerebbe un cambiamento nel gradiente di pressione esistente tra il feto e la placenta. Anomalie della MEC sono state trovate maggiormente nei feti con assenza o inversione del residuo telediastolico in arteria ombelicale. Questo severo quadro Doppler flussimetrico è stato considerato come derivante da un aumento enorme delle resistenze vascolari placentari in questi feti. E' stata sottolineata, inoltre, la presenza di componenti collageniche normali, cioè di tipo fetale, nelle placente di feti con normale velocimetria Doppler dell'arteria ombelicale (7-19).

### ***Capitolo III***

#### ***Valutazione delle proteine non collageniche della matrice e flussimetria***

#### ***Doppler ombelicale nel ritardo di crescita intrauterino.***

#### ***Premessa***

La matrice extracellulare si trova nella zona giunzionale in maniera preponderante. Questo è il sito placentare ove trofoblasto fetale e cellule deciduali materne si mescolano.

Le componenti non collageniche della matrice extracellulare sembrano avere un ruolo importante nei processi angiogenetici e nella immunomodulazione.

Il ruolo di queste componenti è stato ed è ampiamente indagato nella comprensione dei meccanismi della carcinogenesi tumorale.

Tra le varie glicoproteine della matrice la tenascina viene espressa durante l'epoca embrionaria, nello sviluppo tumorale, nei processi di riparazione, nei processi di proliferazione cellulare, nei fenomeni di immunomodulazione. Essa sembra avere un ruolo importante nella placentazione (20).

Nella placenta umana, infatti, tutti i fenomeni su descritti, giocano un ruolo di primario rilievo. Va da sé che tale condizione rappresenta la conditio sine qua non per la normale crescita fetale.

Lo sviluppo placentare e la differenziazione sono caratterizzati dalla presenza di fibrina e metaboliti fibrinoidi. Studi recenti suggeriscono che un danno del trofoblasto sinciziale si traduca in depositi fibrinoidi che fungono da substrato alle riparazioni del danno, innescando un processo di epitelizzazione (17).

Inoltre, è stato dimostrato che la matrice di fibrina può modulare la differenziazione morfologica del trofoblasto umano in sinciziotrofoblasto, realizzando un meccanismo di riparazione dei villi.

Tali considerazioni, sposano il possibile ruolo che la placenta gioca in maniera attiva nel controllo della funzione immune locale a livello dell'interfaccia materno-fetale.

Infatti, sono stati individuati, nello sviluppo della placenta, vari aspetti dell'espressione della tenascina in relazione alle interazioni epitelio-mesenchimali, alla proliferazione cellulare, alla deposizione di fibrina.

Pertanto dall'acquisizione di un modello di fisiologica espressione della tenascina nello sviluppo placentare normale, il nostro studio si propone di valutare espressione e ruolo di questa glicoproteina nelle placente anomale di feti affetti da ritardo di crescita da insufficienza placentare allo scopo di chiarire ulteriori aspetti della patogenesi dell' IUGR.

### ***Obiettivi dello studio***

Scopo del nostro studio è stato quello di analizzare le componenti non collageniche della matrice extracellulare placentare, basandoci sul coinvolgimento delle stesse, in processi di rimodellamento e ristrutturazione placentare che avvengono durante tutto lo sviluppo embrionale. In particolare è stata valutata la supposta presenza di un'associazione fra tenascina e meccanismi di riparo, data la sua espressione vicino ai depositi di fibrina (17).

Abbiamo eseguito indagini immunoistochimiche, per verificare e descrivere le differenze qualitative e quantitative di laminina, fibronectina e tenascina in gravidanze normali e in gravidanze complicate da ritardo di crescita intrauterino, ed, in ultimo, abbiamo correlato questi cambiamenti con quelli che avvengono nella flussimetria Doppler dei vasi ombelico-placentari.

### *Pazienti e metodi*

Abbiamo esaminato trentuno pazienti gravide afferite al nostro ambulatorio di Gravidanza a rischio a partire dalla 28° settimana di amenorrea con età media di 31aa.

Il gruppo di studio (gruppo A) era formato da 21 pazienti con gravidanza complicata da IUGR con o senza gestosi ipertensiva. Precisamente 11 gravide presentavano IUGR asimmetrico e ipertensione e 10 gravide solo IUGR.

I feti sono stati considerati affetti da ritardo di crescita asimmetrico quando i parametri biometrici addominali erano al di sotto del 10° percentile per le curve di crescita fetale della nostra popolazione.

Tutte le pazienti del gruppo A sono state sottoposte a taglio cesareo.

Il gruppo controllo (Gruppo B) era costituito da dieci gravide omogenee alle precedenti per età, settimane al parto, con feti non affetti da IUGR fetale e senza altra patologia materna.

Le pazienti del gruppo B sono state sottoposte a taglio cesareo in caso di presentazioni anomale, minaccia di parto pretermine e taglio cesareo pregresso.

Queste indicazioni sono state scelte per escludere altre patologie placentari che non potevamo controllare.

L'epoca gestazionale è stata stabilita con la determinazione ecografica del Crown-Rump-Lenght eseguita nel primo trimestre di gravidanza.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a screening infettivologico (Complesso TORCH) con esito negativo.

Abbiamo così monitorato le pazienti: controllo quotidiano dei parametri clinici ed ematochimici, valutazione ecografica settimanale della crescita

fetale e flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale con apparecchiatura ecografo Toshiba Nemio 30, Toshiba Aplio, Hitachi H21.

Gli esami Doppler, effettuati con cadenza pari a tre volte a settimana, sono stati eseguiti come di seguito riportato: è stato identificato un tratto libero di cordone ombelicale, fluttuante nel liquido amniotico e distante dall'inserzione ombelicale e placentare, per il campionamento dell'arteria ombelicale (21). Tale campionamento è stato eseguito da uno stesso operatore.

Le alterazioni Doppler flussimetriche dell'arteria ombelicale sono definite lievi con valori di  $PI > 2 DS$  per epoca gestazionale, moderate quando è assente il flusso in fase telediastolica e severo con un' inversione di tale flusso.

Le pazienti che presentavano alterazioni moderate e severe del PI venivano sottoposte a controllo Doppler flussimetrico quotidiano.

I campioni di placenta ottenuti alla nascita sono stati sottoposti ad esame immunohistochimico. Tutti i campioni di placenta sia del gruppo controllo che del gruppo di studio sono stati sezionati in maniera random sia dal lato materno che dal lato fetale della placenta. Dopo una valutazione macroscopica, la placenta è stata fissata in una soluzione salina di formolo per 5-7 gg. Sono state realizzate almeno 8 biopsie, ottenute da ciascun lato della placenta (cioè sia dal lato materno che fetale) iniziando dal centro verso il bordo in modo da ottenere informazioni su multipli siti placentari. Abbiamo evitato accuratamente di realizzare le biopsie nelle zone che macroscopicamente apparivano infartuate. Le sezioni seriate, dello spessore di 6-8 micron, sono state quindi fissate in liquido di Bouin per poi essere incluse in paraffina o congelate in azoto liquido e immagazzinate a –80°C per essere sezionate al criostato. Le sezioni seriate sono state studiate con il metodo perossidasi-antiperossidasi, per evidenziare in microscopia ottica la eventuale immunopositività ai seguenti anticorpi:

1. anticorpi monoclonali antitenascina (IgG) ed antilaminina (IgM)  
(SIGMA ALDRICH).

2. anticorpo policlonale antifibronectina (IgG). (SIGMA ALDRICH).

Le valutazioni al microscopio sono state eseguite da tre osservatori indipendenti su una scala a 4 punti dalla completa assenza di immunopositività (-) ad una immunopositività molto marcata (+++) utilizzando un apparecchio Leica DMLB equipaggiato per la microfotografia.

Alla nascita sono stati considerati i pesi in rapporto all'epoca del parto e divisi in percentili di crescita per epoca gestazionale.

L'analisi della varianza ad una via è stata utilizzata per comparare le caratteristiche cliniche dei due gruppi (ANOVA, EPISTAT Statistical package, Gettis School, Texas 1985).

## ***Risultati***

Nella tabella 1 sono rappresentate le caratteristiche cliniche delle popolazioni studiate.

Vi sono differenze statisticamente significative nei pesi alla nascita, pesi delle placenti, mortalità e morbilità perinatale tra il gruppo di studio e il gruppo controllo.

Per quanto riguarda la flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale, gli indici di pulsatilità erano normali nel gruppo controllo.

Erano, invece, alterati nel gruppo di studio nel quale si sono verificati nove casi con  $PI > 2DS$  in nove feti con peso alla nascita tra il 5° e il 10° centile (LBW) e dodici casi di flusso assente o invertito in dodici neonati di peso inferiore al 5° centile alla nascita (VLBW) (tab. 1).

Le gravidanze dei nove feti IUGR LBW erano in cinque casi complicate da preeclampsia. Le gravidanze dei dodici feti IUGR VLBW erano in sei casi complicate da preeclampsia (tab. 1).

In tutte le pazienti il parto è stato espletato attraverso taglio cesareo.

L'espressione di tenascina nei controlli è risultata più bassa rispetto al gruppo di studio (tab. 2).

Complessivamente si è avuta una elevata immunopositività per la laminina in tutti i casi. Per quanto riguarda la fibronectina, la presenza di questa proteina è considerevole in entrambi i gruppi (tab. 2 e 3).

Per quanto riguarda l'espressione della tenascina nel gruppo di studio, si è verificata una immunopositività più elevata nei feti affetti da ritardo di crescita con peso alla nascita tra il 5° ed il 10° centile (LBW) e parametri Doppler flussimetrici anomali con aumento delle resistenze vascolari con  $PI > 2 DS$  rispetto ai controlli (tab. 3) (fig. 1).

I feti affetti da grave IUGR con peso alla nascita inferiore al 5° centile (VLBW) mostrarono assenza di flusso in diastole con inversione dello stesso in arteria ombelicale ed immunopositività alla tenascina debole o assente (tab. 3) (fig. 2).

Non ci sono state differenze in termini di immunopositività nell'espressione delle molecole indagate: tenascina, laminina e fibronectina tra lato materno e lato fetale della placenta.

## *Discussione*

I ben noti cambiamenti strutturali e funzionali che avvengono nella placenta durante la gravidanza conducono a modifiche dei rilievi Doppler flussimetrici che si estrinsecano in una progressiva riduzione della resistenza in a.ombelicale (22-23). Nei feti IUGR le modifiche ultrastrutturali placentari, con un aumento della rigidità della matrice extracellulare, si estrinsecano in un aumento delle resistenze in arteria ombelicale fino all'assenza o all'inversione del flusso telediastolico.

Il ruolo delle componenti della MEC dei tessuti ha assunto negli ultimi anni sempre più importanza dato l'aumento dei dati sulle funzioni trofiche e meccaniche di queste (24-25). Il nostro interesse sulle componenti non collageniche della matrice extracellulare nasce dalla conoscenza di capacità adesive, antiadesive e morfogenetiche che alcune di esse

mostrano durante lo sviluppo embrionale. Queste attività sono limitate a periodi relativamente brevi della vita dell'organismo, passati i quali l'attività di sintesi di queste proteine diminuisce drammaticamente; solo in caso di neoplasia o di neoformazione anche di tipo cicatriziale, queste strutture fanno nuovamente la loro comparsa anche nell'adulto (26). Questo comportamento ben noto per la tenascina, rende particolarmente interessante lo studio della sua comparsa e della sua distribuzione in un organo ad altissima attività metabolica e che ospita varie popolazioni cellulari, quale appunto la placenta. Per la tenascina, inoltre, sono state ipotizzate funzioni di immunomodulazione e protezione del feto, ma anche di modulazione positiva della migrazione cellulare: l'osservazione di un forte aumento della tenascina in casi di gestosi e' una ulteriore conferma dell'ipotesi patogenetica immunitaria della patologia (27). L'attività tenascinica particolarmente espressa nelle prime fasi della placentazione va riducendosi con l'invecchiamento placentare (28). Sorprendentemente nei

casi di IUGR del terzo trimestre da noi studiati e' stato possibile evidenziare una espressione ancora elevata della tenascina anche se con una distribuzione a mosaico nell'ambito dell'organo stesso. Da sottolineare è l'aumento della fibronectina; la già segnalata associazione con la tenascina nella strutturazione dell'asse del villo e delle strutture attraversate in modo più efficiente dalle cellule migranti, rende particolarmente interessante questo dato.

Di notevole interesse speculativo sembra essere l'associazione tra aumento della tenascina e basso peso alla nascita nei feti IUGR LBW, in cui la compromissione Doppler flussimetrica era meno grave ( $PI > 2 DS$ ), rispetto ai feti con ARED flow, sia in caso di IUGR isolato, sia nei casi complicati da preeclampsia.

La presenza di tenascina nella matrice extracellulare placentare è stata correlata alle funzioni immunomodulatorie delle glicoproteina stessa.

Il riscontro immunostochimico simile, sia nei feti affetti da IUGR isolato sia in quelli da IUGR complicata da PE, così come le correlazioni precedentemente osservate dal nostro gruppo per le molecole collageniche, indicherebbero in un danno immunologico una comune patogenesi nelle due condizioni: ritardo di crescita e preeclampsia (29).

È generalmente riconosciuto che il sinciziotrofoblasto forma una barriera perfetta agli antigeni materni. Tuttavia questa barriera, anche nelle gravidanze normali, è interrotta localmente da fenomeni degenerativi. In queste aree sono state osservate isole cellulari, colonne cellulari e villi periferici riempiti da sostanze fibrinoidi ricche di matrice. La tenascina è espressa nello stroma fetale direttamente adiacente a queste sostanze fibrinoidi. Sulla scorta di queste evidenze è stata ipotizzata una funzione di immunoprotezione della glicoproteina stessa a livello delle sostanze fibrinoidi.

Un'altra importante funzione della tenascina è quella di promuovere l'angiogenesi. I grossi vasi fetali del piatto coriale mostrano immunopositività alla tenascina durante tutto l'arco della gravidanza (30).

Ericksen e Lightner descrivevano nel 1988 immunoreattività della tenascina non soltanto nei grossi vasi tumorali ma anche nella parete dei capillari (30).

L'effetto sinergico con la laminina nel promuovere l'angiogenesi potrebbe sottendere nei feti affetti da IUGR in condizioni meno gravi, con flussimetria Doppler ombelicale alterata in maniera meno severa dei casi con ARED flow, un possibile meccanismo di compenso.

È noto che nelle placenti durante tutto l'arco della gravidanza avvengono continui fenomeni di rimaneggiamento e di riparazione.

L'insufficienza placentare è responsabile del ritardo di crescita intrauterino per alterazioni gravi degli scambi materno fetali di ossigeno e nutrienti.

Nei casi di maggiore elasticità della matrice, sia in termini di componenti collageniche che non, si osserva un ritardo di crescita meno severo (31).

Probabilmente la tenascina, in sinergia con altre glicoproteine, giocherebbe un ruolo importante nei meccanismi di riparo e nella promozione dell'angiogenesi in quei feti con maggiore capacità di recupero. Ciò si traduce con alterazioni Doppler flussimetriche ombelicali meno severe, un peso alla nascita basso, ma non al di sotto del 5° centile, una migliore prognosi con minore natimorbilità e natimortalità. Tale risultato indica che, le correlazioni tra immunoistochimica placentare e flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale, ben lungi dall'aver espresso tutto il loro potenziale speculativo, rimangono comunque un'interessante espressione dei molteplici fenomeni che si realizzano nel letto placentare, naturale distretto a valle del vaso indagato.

## *Capitolo IV*

### *Importanza dell'approccio multidisciplinare nello studio dell'etiogenesi dello IUGR e prospettive*

Nel corso dei quattro anni del dottorato, la ricerca scientifica è sembrata correre più veloce del tempo stesso.

Dai timidi tentativi di andare oltre lo studio della morfologia placentare con la valutazione immunologica della stessa, eseguita nei primi anni '70, siamo giunti alla fine valutazione immunoistochimica, ad un passo dalla biologia molecolare compiuta dei nostri giorni.

I nostri studi, crediamo, hanno espresso il tentativo massimo che è alle fondamenta della ricerca: la possibilità di unire la ricerca di base con la ricerca clinica.

Da un lato, infatti, abbiamo esplorato le variazioni in diverse condizioni di una molecola quale la tenascina, sicuramente poco studiata fino ad oggi in campo ostetrico, e dall'altro una delle migliori e più moderne tecnologie per la valutazione del benessere fetale: la flussimetria Doppler.

Esiste, probabilmente, una via speculativa che riteniamo strategica nella valutazione dei nostri studi: la variazione Doppler flussimetrica dell'espressione tenascinica a livello placentare. Sorprendentemente ed al di là di qualunque verosimile aspettativa, nella popolazione da noi studiata i feti con maggiore compromissione clinica e Doppler flussimetrica mostrano un'espressione tenascinica inferiore non solo ai feti del gruppo di controllo, ma anche ai feti in condizioni cliniche e Doppler flussimetriche che definiremo intermedie tra la fisiologia e l'estrema patologia.

Sorge, quindi, il sospetto che la ridotta espressione tenascinica nei feti con maggiore compromissione della crescita sia un fallimento nei sistemi riparativi/compensativi placentari.

D'altro canto, l'esperienza clinica e la letteratura mostrano inequivocabilmente una fluttuazione nel parametro flussimetrico dell'arteria ombelicale tra la 28° e la 32° settimana nei feti con ritardo di crescita, fluttuazione che persiste fino all'eventuale instaurarsi dell'inversione di flusso in arteria ombelicale (32, 33, 34, 35, 36).

È verosimile a questo punto giustificare il sospetto che tale fluttuazione dipenda in maniera considerevole dai continui tentativi riparativi placentari realizzati anche attraverso un aumento dell'espressione della tenascina.

Non va dimenticato, del resto, che proprio il periodo 28-32 settimane è il periodo in cui generalmente si giocano le sorti di un feto con ritardo di crescita.

Un rallentamento della crescita in questo periodo può essere recuperato dal feto o può rappresentare l'inizio di una severa restrizione della crescita.

Volendo spingere la nostra speculazione anche oltre, non possiamo considerare casuale che, proprio dopo la 28° settimana di gestazione, il cervello fetale mostra la maggiore proliferazione corticale con un notevole incremento delle circonvoluzioni.

Esiste probabilmente nella vita intrauterina una fase che ingloba, appunto, anche il quarto periodo di sviluppo cerebrale fetale di Laroche (37) che rappresenta il periodo in cui si giocano le sorti di un essere umano.

Del resto la tecnologia Doppler flussimetrica ci ha insegnato che il feto invia dei segnali per manifestare le proprie condizioni di stress, quali la bradicardia, le decelerazioni, la tachicardia, che rappresentano comunque ancora delle fasi estreme di compenso fetale all'ipossia; parimenti le fluttuazioni in arteria ombelicale, che per significato potremmo associare alle decelerazioni, potrebbero essere un segnale placentare di estrema compensazione.

Tutto ciò, comunque, offre il fianco a considerazioni prospettiche.

Se in epoca di sequenziamento genomico e terapia genica è possibile cambiare il corso della vita di un essere umano, altrimenti compromesso, è possibile ipotizzare in un futuro non per forza lontano, che la terapia genica possa intervenire nel miglioramento delle condizioni placentari, favorendo il proseguimento in utero della vita di un feto altrimenti condannato ad una precoce vita extrauterina non scevra da elevati rischi di ritardo mentale e motorio.

## ***Tabelle e Figure***

|                          | <b>AGA</b><br><b>Gruppo di controllo</b> | <b>IUGR</b><br><b>Gruppo di studio</b> | <b>P</b> |
|--------------------------|--|--|----------|
| N                        | 10                                       | 21                                     |          |
| Età (media +/- DS)       | 21.2 +/- 5                               | 28.8+/-4                               | 0,525    |
| Parità                   | 0.4+/- 0.2                               | 0.6+/- 0.3                             | 0.338    |
| E.G. alla nascita        | 36.1+/- 2.1                              | 35+/- 3.3                              | 0.003    |
| Peso alla nascita (g)    | 3002+/- 420                              | 1680+/- 530                            | <0.001   |
| Peso placenta (g)        | 480+/- 95                                | 298+/- 84                              | <0.001   |
| Pre-eclampsia (n)        | -  | 11/21                                  |          |
| Morbidità perinatale (n) | -  | 20                                     | <0.001   |
| PI > 2 DS (n/%)          | -  | 9/43                                   | <0.001   |
| ARED (n/%)               | -  | 12/57                                  | <0.001   |

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche delle pazienti del gruppo A (AGA) e del gruppo B (IUGR)

| <i>Casi</i> | <i>Peso alla nascita</i> | <i>EG</i>     | <i>Tenascina</i> | <i>Laminina</i> | <i>Fibronectina</i> | <i>Flussimetria Doppler</i> |
|-------------|--------------------------|---------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| PL          | AGA                      | III trimestre | +                | + / ++          | +++                 | PI nella norma              |
| RT          | AGA                      | III trimestre | + / -            | + / ++          | ++ / +++            | PI nella norma              |
| MG          | AGA                      | III trimestre | + / -            | +               | ++ / +++            | PI nella norma              |
| DA          | AGA                      | III trimestre | +                | +               | ++ / +++            | PI nella norma              |
| MP          | AGA                      | III trimestre | +                | +               | +++                 | PI nella norma              |
| GG          | AGA                      | III trimestre | + / -            | + / ++          | ++                  | PI nella norma              |
| SR          | AGA                      | III trimestre | + / -            | +               | +++                 | PI nella norma              |
| ST          | AGA                      | III trimestre | +                | + / ++          | ++                  | PI nella norma              |
| TT          | AGA                      | III trimestre | + / -            | +               | ++ / +++            | PI nella norma              |
| CA          | AGA                      | III trimestre | +                | + / ++          | +++                 | PI nella norma              |

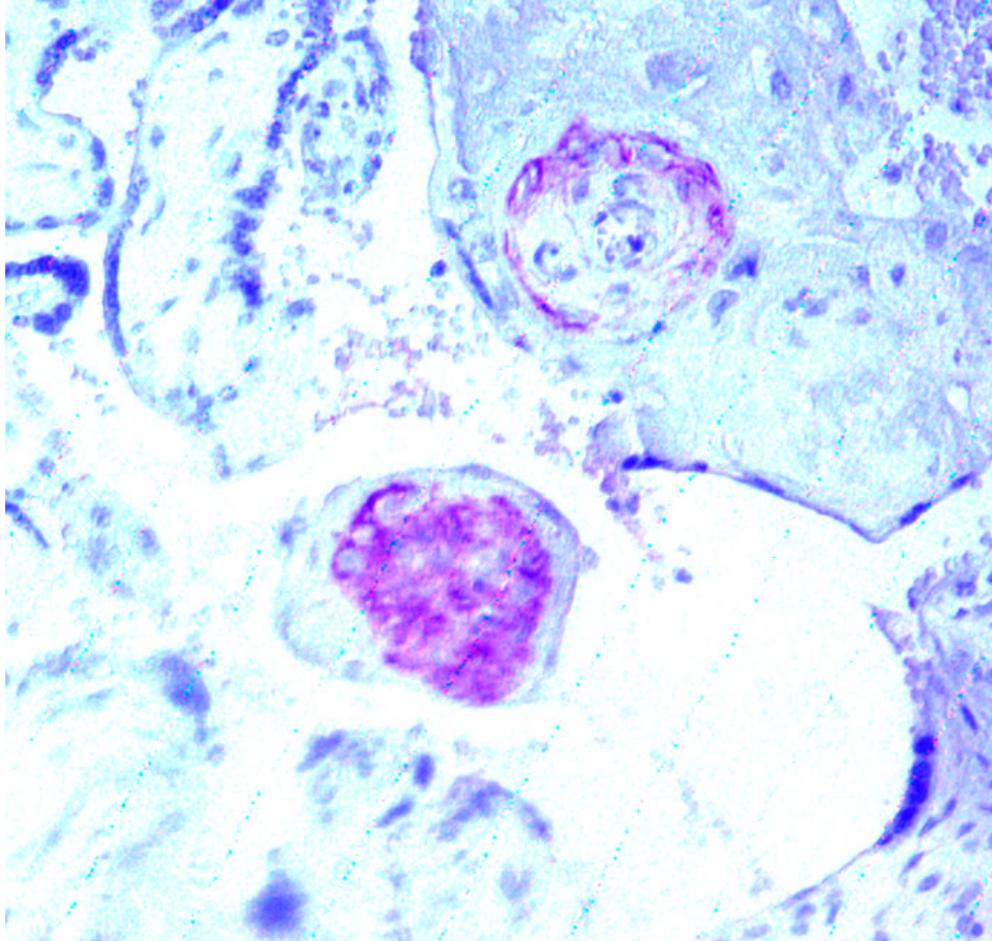
**Tabella 2.** *Riscontro ostetrico , Doppler flussimetrico ed immunoistochimico Gruppo B*

| <b>Casi</b> | <b>Peso alla nascita</b> | <b>EG</b>     | <b>IUGR</b> | <b>IUGR + PE</b> | <b>Tenascina</b> | <b>Laminina</b> | <b>Fibronectina</b> | <b>Flussimetria Doppler</b> |
|-------------|--------------------------|---------------|-------------|------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| DCB         | LBW                      | III trimestre | •           |                  | +++              | ++              | ++                  | P.I.> 2 DS                  |
| GC          | LBW                      | III trimestre | •           |                  | ++               | ++              | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| MM          | LBW                      | III trimestre |             | •                | +++              | +               | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| LM          | LBW                      | III trimestre | •           |                  | +++              | ++              | ++                  | P.I.> 2 DS                  |
| MR          | LBW                      | III trimestre |             | •                | ++/+++           | +               | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| AL          | LBW                      | III trimestre |             | •                | ++/+++           | +               | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| RA          | LBW                      | III trimestre | •           |                  | +++              | +               | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| AT          | LBW                      | III trimestre |             | •                | ++               | ++              | +                   | P.I.> 2 DS                  |
| TF          | LBW                      | III trimestre | •           |                  | +++              | ++              | +                   | P.I. >2 DS                  |
| LP          | LBW                      | III trimestre |             | •                | ++/+++           | +               | +                   | P.I. >2 DS                  |

*Tabella 3A. Riscontro ostetrico, Doppler flussimetrico ed immunoistochimico nei feti LBW, del gruppo A*

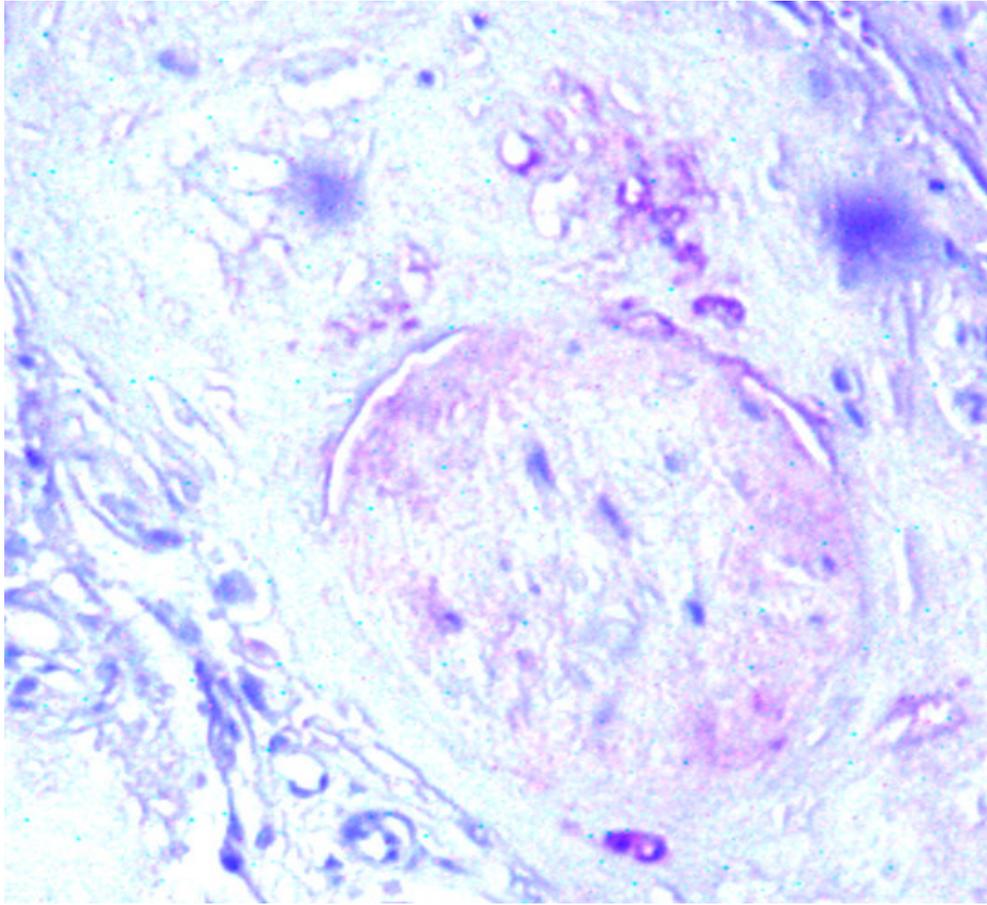
| Casi | Peso alla nascita | EG            | IUGR | IUGR+PE | Tenascina | Laminina | Fibronectina | Flussimetria Doppler |
|------|-------------------|---------------|------|---------|-----------|----------|--------------|----------------------|
| PL   | VLBW              | III trimestre |      | •       | +/-       | +++      | ++           | A.R.E.D.             |
| MS   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +         | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| GM   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +/-       | + /+++   | +++          | A.R.E.D.             |
| LN   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +         | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| AS   | VLBW              | III trimestre |      | •       | ++        | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| DF   | VLBW              | III trimestre |      | •       | -         | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| SB   | VLBW              | III trimestre | •    |         | ++        | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| AR   | VLBW              | III trimestre |      | •       | +/-       | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| RF   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +/-       | +        | ++           | A.R.E.D.             |
| MA   | VLBW              | III trimestre |      | •       | +/-       | +++      | +            | A.R.E.D.             |
| LT   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +         | ++       | ++           | A.R.E.D.             |
| GG   | VLBW              | III trimestre |      | •       | +/-       | ++       | +            | A.R.E.D.             |
| LC   | VLBW              | III trimestre | •    |         | +         | +/-      | ++           | A.R.E.D.             |

**Tabella 3B.** *Riscontro ostetrico, Doppler flussimetrico ed immunoistochimico nei feti VLBW del gruppo A*



**FIGURA 1.**

*Immunopositività per la Tenascina in gravidanza complicata da IUGR-LBW con PI ombelicale > 2 DS (in viola si evidenzia una marcata immunopositività per la Tenascina)*



**FIGURA 2.**

*Immunopositività per la Tenascina in gravidanza di feto IUGR-VLBW con assenza di flusso in diastole in arteria ombelicale (in viola si evidenzia una blanda immunopositività per la tenascina).*

## **BIBLIOGRAFIA**

1. **NAZZARO A., NAZZARO G., et al.**  
Prenatal ultrasound diagnosis of a case of Pfeiffer syndrome without cloverleaf skull and review of the literature.  
Journal of Prenatal Diagnosis, 2003, in press, RE: MS#03-0723
2. **WAUGH J, KILBY M.**  
Intrauterine growth restriction. Diagnosis and management.  
Ed.: Division of Reproduction and Child Health, Birmingham Womens' Hospital.  
Hosp Med 2001 Apr.
3. **DE KLEERSMAECKER B., ALBERT M., et al.**  
Intrauterine growth Restriction.  
Curr Opin Obstet Gynecol. 2002 Apr
4. **ARDUINI F., GIANNINI H., et al.**  
Il ritardo di crescita intrauterino in Catizone F., Ianniruberto A.,  
Prima Hominis Imago.  
CIC edizioni; 12: 317-340, 1997
5. **KONG T.Y., DE WOLF F., et al.**  
Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancy complicated by pre-eclampsia and by small for gestational age infants.  
Br. J. Obstet. Gynaecol., 93, 1049-59, 1986
6. **LYALL F.**  
The human placental bed revisited.  
Placenta, Sep-Oct; 23(8-9): 555-62, 2002

7. **C.-P. CHEN and J. D. APLIN, et al.**  
Placental Extracellular Matrix: Gene Expression, Deposition by Placental Fibroblasts and the Effect of Oxygen.  
Placenta, 24 316-325, 2003
  
8. **LOCCI M., NAZZARO G., et al.**  
Regional response to hypoxaemia and hypercapnea in fetal human brain. Doppler study of different tracts of middle cerebral artery.  
Journal of maternal Fetal Investigation, 6: 214-218, 1996.
  
9. **GALAN HL, FERRAZZI E, et al.**  
Intrauterine growth retardation (IUGR): biometric and Doppler assessment.  
Department of Obstetrics and Gynecology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA.  
Prenat Diagn Apr.2:202-205, 2002
  
10. **OTT WJ.**  
Intrauterine growth restriction and Doppler ultrasonography.  
Mercy Medical Department of Obstetrics and Gynecology, St. John's Center, St. Louis, Missouri 63141,USA.  
Ultrasound Med Oct. 4:435-38, 2000
  
11. **LOCCI M., NAZZARO G.**  
Tecniche Doppler in Trattato di ecografia in ostetricia e ginecologia;  
Editore Poletto, 52-53, 1997
  
12. **STEEL SA., PEARCE JM et al.**  
Early Doppler ultrasound screening in rediction of hypertensive disorders of pregnancy.  
Lancet, 335:1548, 1990
  
13. **ALFIREVIC Z, NELSEN I.**  
Doppler ultrasonography in high risk pregnancies: sistematic rewiev with metanalysis.  
Am J Obstet Gynecol 172:1379, 1995

14. **WESTERGAARD HB, LANGHOFF-ROSS, et al.**  
Doppler ultrasonography in singleton pregnancies at risk of  
intrauterine growth retardation: a national estimate.  
Acta Obstet Gynecol Scand. Jun 6: 623-25, 2002
15. **VERNON RB, SAGE EH**  
Between molecules and morphology  
Extracellular matrix and creation of vascular form.  
Am J Pathol, 1:112-14, 1995
16. **CHIQUET-EHRISMANN R**  
Tenascins, a growing family of ECM proteins.  
Experientia, 3:324-26, 1995.
17. **CASTELLUCCI M., KOSANKE G., et al.**  
Villous sprouting: fundamental mechanism of human placental  
development.  
Hum. Reprod. Update. Review. Sep Oct;365-72, 2000.
18. **NAZZARO A., NAZZARO G., et al.**  
Extracellular matrix in pre eclamptic placentae.  
Gyn Endocrinol.P59, vol 6,1, 1992
19. **LOCCI M., NAZZARO G., et al.**  
Correlation of Doppler and placental immunohistochemical  
features in normal and intrauterine growth-retarded fetuses.  
Ultrasound Obstet Gynecol 3:240-245,1993
20. **KOBAYASHI T., ASAHINA T., et al.**  
The role of adhesive proteins in maintaining pregnancy.  
Placenta 19, A21, 1998.
21. **SOCIETA' ITALIANA DI ECOGRAFIA OSTETRICA E  
GINECOLOGICA**  
Linee Guida SIEOG 2002.

22. **PARDI G, MARCONI AM, et al.**  
Placental-fetal interrelationship in IUGR fetus.  
Placenta ; suppl A: S136-41, Apr, 2002.
23. **MADAZLI R., SOMUNKIRAN A., et al.**  
Histomorphology of the placenta and the placental bed of growth restricted fetuses and correlation with the Doppler velocimetries of the uterine and umbilical arteries.  
Placenta; 24(5): 510-6, May, 2003.
24. **LOCCI M., NAZZARO G., et al.**  
Tenascina e flussimetria Doppler dell'arteria ombelicale nei feti IUGR.  
Atti della Società Italiana di Ginecologia ed Ostetricia  
LXXVIII Congresso, Perugia 9-13 Nov. 2002
25. **MURPHY-ULLRICH J.E.**  
The de-adesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?  
J. Clin. Invest.; 107(7): 785-90. Review. Apr 2001
26. **SAGE E.H.**  
Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages.  
J. Clin. Invest.;107:781-3. Review. Apr 2001
27. **JONES P.L., JONES F.S.**  
Tenascin-C in development and diseases: gene regulation and cell function.  
Matrix Biol.; 19(7):581-96.Review. Dec 2000
28. **SAKAKURA T., KUSAKABE M.**  
Anti-adhesion molecule tenascin of the cell.  
Seikagaku.;72(5):365-72. Review. May 2000

29. **T.M. MAYHEW, C. OHADIKE, et al.**  
Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by preeclampsia with and without intrauterine growth restriction  
Placenta, 24:219-226, 2003.
30. **M. CASTELLUCCI, I. CLASSEN-LINKE, et al.**  
The human placenta: a model for tenascin expression.  
Histochemistry 95:449-458, 1991
31. **MACARA L., KINGDOM JCP, et al.**  
Structural analysis of placental terminal villi from growth-restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler Waveform.  
Placenta, 17:37-48, 1996
32. **HANRETTY KP, WHITTLE MJ, et al.**  
Reappearance of end diastolic velocity in a pregnancy complicated by severe pregnancy-induced hypertension.  
Am J Obstet Gynecol 158: 1123-24, 1988
33. **SENGUPTA S., HARRRIGAN JT, et al.**  
Perinatal outcome following improvement of abnormal umbilical artery velocimetry.  
Obstet Gynecol 78:1062-66, 1991
34. **BELL JG., LUDOMIRSKY A., et al.**  
The effect of improvement of umbilical artery absent end-diastolic velocity on perinatal outcome.  
Am J Obstet Gynecol 167:1015-20, 1992.
35. **KARSDORP VH., VONVUGT JM, et al.**  
Clinical significance of absent or reversed end-diastolic velocity waveforms in umbilical artery.  
Lancet 344: 1664-68, 1994

36. **WESTERGAAED HB, LANGHOFF-ROOS J., et al.**  
A critical appraisal of umbilical artery Doppler ultrasound in high risk pregnancies: use of meta-analysis in evidenced-based obstetrics.  
Ultrasound Obstet Gynecol 17:466-77, 2001
37. **LOCCI M., NAZZARO G., et al.**  
Fetal cerebral haemodynamic adaptation: a progressive mechanism? Pulsed and color Doppler evaluation.  
J of Perinat Med. 20:337-43, 1992.