



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Dottorato di Ricerca in Riproduzione Sviluppo e  
Accrescimento dell’Uomo – XXI ciclo**

**Coordinatore: *Prof. C. Pignata***

**TESI**

**La fibromatosi uterina:  
ipotesi eziopatogenetiche e strategie terapeutiche**

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof.  
Andrea Di Lieto**

**CANDIDATA**

**Dott. Marianna De Falco**

**ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

## INDICE

<b>Introduzione</b> .....	pag. 3
<i>La fibromatosi uterina: epidemiologia e sintomatologia</i> .....	pag. 3
<i>La fibromatosi uterina: eziopatogenesi</i> .....	pag. 5
<i>La fibromatosi uterina: terapia</i> .....	pag. 10
<i>La fibromatosi uterina: effetti della terapia medica pre-chirurgica della fibromatosi uterina sull'angiogenesi, la proliferazione cellulare e l'apoptosi dei leiomiomi uterini</i> .....	pag. 18
<b>Terapia prechirurgica della fibromatosi uterina: aspetti clinici ed espressione del Transforming Growth Factor- <math>\beta</math>3 e del Connective Tissue Growth Factor</b> .....	pag. 29
<i>Materiali e metodi</i> .....	pag. 34
<i>Risultati</i> .....	pag. 40
<i>Discussione e conclusioni</i> .....	pag. 51
<i>Pubblicazioni</i> .....	pag. 58

<b>La pseudocapsula dei leiomiomi uterini dopo terapia prechirurgica con agonisti del GnRH: relazione tra aspetti clinici e modifiche immunoistochimiche.....</b>	<b>pag. 72</b>
<i>Materiali e metodi.....</i>	<i>pag. 75</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>pag. 81</i>
<i>Discussione e conclusioni.....</i>	<i>pag. 86</i>
<i>Pubblicazioni.....</i>	<i>pag. 91</i>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>pag. 116</b>
<b>Pubblicazioni relative alle linee di ricerca trattate nel corso del Dottorato di Ricerca in Riproduzione Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo e non inserite nel Programma di Ricerca oggetto della Tesi.....</b>	<b>pag. 138</b>

## **Introduzione**

### *La fibromatosi uterina: epidemiologia e sintomatologia*

I leiomiomi uterini sono le neoplasie benigne più frequenti nelle donne in età fertile. Si riscontrano nel 20-50% delle donne all'età di 30 anni (1); l'incidenza aumenta con l'età ed è più elevata in alcuni gruppi etnici, soprattutto in quello afro - caraibico (2).

L'impatto della fibromatosi uterina sul benessere della donna è notevole, se si considera che essa costituisce l'indicazione principale all'isterectomia in età premenopausale (3).

In base alla localizzazione, i leiomiomi uterini possono essere suddivisi in: sottomucosi (a sviluppo nella cavità uterina, al di sotto dell'endometrio), intramurali (localizzati nello spessore del miometrio) e sottosierosi (sessili o peduncolati, a partenza dalla superficie dell'utero, al di sotto della sierosa peritoneale).

Nel 50-60% dei casi i fibromi uterini sono asintomatici e vengono diagnosticati occasionalmente durante una visita ginecologica o un controllo ecografico. Negli altri casi, la paziente può lamentare menometrorragia, a

volte di entità tale da indurre anemia; sintomi da compressione della vescica (pollachiuria e/o ritenzione urinaria) o del retto (stipsi); dolore da compressione sugli organi vicini o sui plessi nervosi (dolore di tipo sciatico).

Attualmente, non esistono sufficienti evidenze in letteratura a conferma di un possibile ruolo della fibromatosi uterina come causa o concausa di infertilità. Analogamente, non sono riportati risultati di studi prospettici che mostrino una correlazione tra la presenza di leiomiomi intramurali o sottosierosi ed un' aumentata incidenza di aborti spontanei. Per quanto riguarda i leiomiomi sottomucosi, invece, potrebbe essere prudente rimuoverli, ad es. per via isteroscopica, in pazienti con abortività ricorrente in assenza di altre anomalie.

### *La fibromatosi uterina: eziopatogenesi*

Nonostante gli effetti ampiamente dimostrati degli steroidi sessuali sull'accrescimento dei leiomiomi, l'eziopatogenesi della fibromatosi uterina è ancora in parte sconosciuta.

*Anomalie citogenetiche.* I leiomiomi uterini sono neoplasie monoclonali originanti dalla mutazione somatica di un miocita progenitore. Circa il 50% dei leiomiomi uterini presenta aberrazioni cromosomiche (4, 5). Il difetto più comunemente osservato è una traslocazione reciproca che coinvolge i cromosomi 12q15 e 14q24. Il gene interessato, *HMGIC*, sul cromosoma 12, codifica per un fattore di trascrizione, la proteina HMGIC. Il risultato della traslocazione è la sintesi di un trascritto chimerico che funge da transattivatore e, presumibilmente, induce un accrescimento eccessivo delle fibrocellule muscolari lisce costituenti il leiomioma (6). Tuttavia, nonostante numerosi studi, i dati presenti in letteratura circa il ruolo effettivo delle anomalie citogenetiche nell'eziopatogenesi della fibromatosi uterina sono tuttora non univoci né è chiaro il motivo per cui tali alterazioni manifestino i loro effetti nel miometrio e non anche in altri tessuti dell'adulto.

*Ruolo degli steroidi sessuali.* Sebbene l'esatta eziologia sia sconosciuta, il ruolo degli ormoni sessuali è fondamentale per l'insorgenza e l'accrescimento dei leiomiomi uterini. Questi ultimi, infatti, sono tipici dell'età fertile, aumentano di volume in gravidanza e regrediscono dopo la menopausa (7).

Gli estrogeni ed i relativi recettori sono fondamentali nella patogenesi dei leiomiomi (8). Rispetto al miometrio normale, i leiomiomi presentano un'abnorme espressione genica di recettori per gli estrogeni, che determina un'elevata sensibilità a questi ormoni durante la fase proliferativa del ciclo mestruale (9). Inoltre, cellule di leiomiomi in coltura presentano una risposta agli estrogeni significativamente più intensa rispetto alle cellule miometriali sane, soprattutto se prelevate nella fase proliferativa del ciclo mestruale (10). La dimostrazione semiquantitativa immunohistochimica dell'espressione dei recettori per estrogeni e progesterone correla con il tasso di accrescimento dei leiomiomi (11).

Anche il progesterone, al pari degli estrogeni, sembra svolgere un ruolo eziopatogenetico nella fibromatosi uterina. Recentemente, alcuni Autori (12) hanno dimostrato che il progesterone induce una up-regulation dell'espressione dell'antigene nucleare PCNA (proliferative cell nuclear

antigen), indicatore di proliferazione cellulare, nelle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi uterini. Inoltre, il progesterone ha un effetto simile sulla proteina Bcl-2, che inibisce la morte cellulare mediata da apoptosi (12).

*Fattori di crescita.* I fattori di crescita polipeptidici partecipano a numerosi eventi cellulari e tissutali, incluse la morfogenesi, l'angiogenesi, la cicatrizzazione e la risposta immunitaria. Mutazioni tali da alterare i circuiti regolatori innescati dai fattori di crescita possono interferire con il controllo dell'accrescimento cellulare e delle interazioni cellula-cellula, favorendo lo sviluppo di neoplasie.

Sebbene non siano ancora state individuate mutazioni specifiche eziologicamente connesse alla fibromatosi uterina, ci sono significative evidenze che gli effetti degli steroidi ovarici sull'insorgenza e l'accrescimento dei leiomiomi uterini, per quanto riguarda sia l'incremento della proliferazione cellulare che la deposizione di matrice extracellulare, siano almeno in parte mediati da pathway di fattori di crescita, prodotti localmente e agenti con meccanismo autocrino o paracrino (9, 13, 14).

I fattori di crescita il cui ruolo nella fibromatosi uterina è meglio conosciuto sono: Epidermal Growth Factor (EGF) (15), Insulin-like Growth

Factors I e II (IGF-I, IGF-II) (16, 17), Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (14), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (18, 19), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (20), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (21, 22).

*Angiogenesi e vascolarizzazione.* L'accrescimento dei leiomiomi uterini necessita di un adeguato apporto vascolare. La distribuzione della rete vascolare è stata studiata da molti Autori, ma con risultati spesso contrastanti. Recentemente, è stata messa a punto una tecnica di studio (23) basata sulla iniezione, attraverso i vasi afferenti di miomi ottenuti in seguito ad autopsie, di una resina e sulla successiva corrosione dopo la polimerizzazione della resina stessa. In questo modo, si ottiene un calco dell'intera rete vascolare del mioma. Questa tecnica ha consentito di dimostrare che i fibromi più piccoli (1-3 mm) sono avascolari, quelli lievemente più grandi (<1 cm) sono irrorati da pochi vasi sanguigni di piccolo calibro, che raggiungono la lesione dalla periferia. I miomi >1 cm contengono una rete vascolare irregolare con densità simile o inferiore a quella del miometrio normale circostante e sono circondati da una "capsula vascolare" estremamente densa, che fornisce l'apporto vascolare determinante per l'accrescimento. Probabilmente, durante lo sviluppo dei leiomiomi, i vasi sanguigni preesistenti vanno incontro a

regressione e vasi neoformati invadono la lesione dalla periferia. La formazione di tali vasi è dovuta ad un processo di angiogenesi, molto attiva alla periferia del mioma, promossa da fattori di crescita polipeptidici prodotti localmente dallo stesso mioma. Tra i fattori di crescita angiogenetici coinvolti nella fibromatosi uterina, i più studiati sono il PDGF, il bFGF ed il VEGF. Una disregolazione locale di tali fattori o dei loro recettori è stata ipotizzata nella eziopatogenesi della fibromatosi uterina (24).

### *La fibromatosi uterina: terapia*

La scelta del tipo di trattamento da attuare in pazienti con fibromatosi uterina dovrebbe tener conto di alcuni punti chiave: il rapporto rischio-beneficio delle diverse modalità terapeutiche; il tasso di recidiva e, quindi, la necessità di terapie ripetute o aggiuntive; l'impatto di un trattamento ripetuto; il desiderio di prole della paziente; la sintomatologia; il volume e la sede dei fibromi; l'effetto della terapia sulla qualità di vita della paziente.

In una recente review sistematica della letteratura circa il trattamento chirurgico e non chirurgico della fibromatosi uterina, gli Autori non hanno potuto fornire risposte chiare ai punti chiave indicati precedentemente, a causa della mancanza di dati univoci su molte variabili precliniche e sull'outcome (24, 25).

*Terapia chirurgica.* In donne che non hanno desiderio di prole, l'isterectomia è considerata una terapia definitiva per la fibromatosi uterina. Essa elimina il rischio di recidiva e migliora sensibilmente la qualità di vita della paziente (26, 27). Una review sistematica della letteratura (28) suggerisce un aumentato rischio di incontinenza urinaria in seguito a

laparoisterectomia totale; tuttavia, un più recente studio prospettico (29) dimostra che non ci sono sequele negative sulla funzione degli organi pelvici.

L'isterectomia è un intervento gravato da morbidità significativa nel 3% dei casi e da morbidità minore in circa il 14% dei casi (30). La mortalità è 1-2 per mille (31).

L'isterectomia non è indicata in pazienti giovani desiderose di prole. Inoltre, non tutte le donne non desiderose di ulteriori gravidanze accettano un intervento demolitore, per i risvolti psicologici che scaturiscono dalla perdita di un organo che ha un alto valore simbolico.

La miomectomia laparotomica rappresenta un approccio chirurgico conservativo per la fibromatosi uterina, che consente di ottenere la risoluzione dei sintomi da metrorraggia e del dolore pelvico in circa l'80% dei casi (32).

La miomectomia laparoscopica è associata con un ricovero ospedaliero di minore durata ed un decorso post-operatorio più breve, con conseguente riduzione di costi (33). Tuttavia, si tratta di un intervento tecnicamente dispendioso ed indicato per miomi con un range limitato di caratteristiche. Inoltre, la miomectomia laparoscopica presenta un rischio di conversione in laparotomia variabile da 1.8% a 8% nelle varie casistiche (34, 35).

La miomectomia per via vaginale è una tecnica chirurgica relativamente recente. Può essere preceduta da una laparoscopia diagnostica (36) oppure essere laparoscopicamente assistita (37). Quest'ultima modalità sembra facilitare l'emostasi e la ricostruzione dell'utero rispetto al solo approccio laparoscopico.

La miomectomia, soprattutto per via laparotomica, è associata con maggiore perdita ematica intraoperatoria, tempi chirurgici più lunghi, dolore, morbilità post-operatoria e ricoveri ospedalieri di maggiore durata rispetto all'isterectomia; inoltre, nel 20-25% dei casi è necessario un ulteriore trattamento (38). Il rischio di recidiva dopo miomectomia è stimato in percentuali diverse dai vari Autori; in ogni caso, esso limita l'efficacia a lungo termine dell'intervento. Inoltre, la miomectomia può determinare una sindrome aderenziale, di minore entità con la laparoscopia, che può incidere negativamente sulla fertilità, causare dolore pelvico cronico, incrementare il rischio di gravidanza ectopica e di rottura di utero gravido e, occasionalmente, provocare occlusione intestinale (25).

*Terapia medica: analoghi del GnRH.* Attualmente, gli analoghi del GnRH (GnRH-a) rappresentano la principale modalità di terapia medica della

fibromatosi uterina. Attraverso la down-regulation dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, essi inducono un ipogonadismo ipogonadotropo temporaneo e reversibile. Lo stato ipoestrogenico che ne deriva induce una riduzione di volume dell'utero e dei fibromi che, in alcuni trial, ha raggiunto il 50-70% (39). Inoltre, i GnRH-a consentono il controllo della meno-metrorragia, e della conseguente anemia, e dei principali sintomi associati alla fibromatosi uterina. Tuttavia, tali effetti sono rapidamente reversibili al termine del trattamento: pertanto, in pazienti in età premenopausale la somministrazione dei GnRH-a è spesso considerata una terapia prechirurgica.

L'esatto meccanismo con cui i GnRH-a inducono la riduzione di volume dell'utero è ancora sconosciuto. Tuttavia, sono stati ipotizzati un effetto diretto o indiretto sull'attività di alcuni fattori di crescita (17, 19, 40), un'induzione dell'apoptosi (41), un'alterazione della vascolarizzazione (23, 40, 42). Dopo terapia con GnRH-a, l'intervento chirurgico risulta più agevole e breve, con minore perdita ematica, minore ricorso ad incisioni laparotomiche longitudinali, possibilità di un approccio vaginale o conservativo in un maggior numero di pazienti e decorso post-operatorio più breve (40). Un problema frequentemente riscontrato nella pratica clinica, ma poco studiato, è la difficoltà di enucleazione dei fibromi dopo trattamento con GnRH-a, dovuta

ad una ridotta consistenza della lesione e al fatto che la terapia rende meno facilmente distinguibili i piani di clivaggio (41). Tale condizione, tuttavia, è compensata dalla ridotta perdita ematica intra- e post-operatoria, da una minore durata dell'intervento dovuta alle ridotte dimensioni dell'utero e dei miomi e dalla maggiore facilità di accesso chirurgico.

La durata della terapia con GnRH-a è fortemente limitata dal manifestarsi di sintomi simil-menopausali (es. vampate di calore) e di un'accelerata perdita di massa ossea, dovuti allo stato ipoestrogenico. Per far fronte a tali effetti collaterali, senza compromettere l'efficacia terapeutica, sono stati messi a punto diversi schemi di terapia "add-back".

*Terapia medica: terapia "add-back" con tibolone.* Il tibolone è uno steroide sintetico strutturalmente correlato al noretinodrel, modulatore tessuto-selettivo dei recettori estrogenici, con effetti combinati di tipo progestinico, estrogenico e androgenico. È utilizzato nel trattamento dei sintomi climaterici e per prevenire la demineralizzazione ossea postmenopausale senza indurre una significativa stimolazione dell'endometrio (42).

Dopo somministrazione orale, il tibolone è convertito in tre diversi metaboliti che, al contrario del tibolone stesso, mostrano un'alta affinità di

legame per i recettori degli steroidi sessuali ovarici. Gli isomeri 3 $\alpha$ -idrossi- e 3 $\beta$ -idrossi-derivati si legano prevalentemente ai recettori per gli estrogeni e sono responsabili degli effetti estrogeno-simili sull'osso e sul trattamento delle vampate di calore. L'isomero  $\Delta^4$ , prodotto nell'endometrio dalla 3 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi/isomerasi, si lega soprattutto ai recettori per gli androgeni e il progesterone ed è responsabile degli effetti atrofizzanti sull'endometrio.

Alcuni studi hanno valutato l'efficacia dell'associazione del tibolone ai GnRH-a nella terapia prechirurgica a breve e a lungo termine della fibromatosi uterina (43, 44, 45, 46), riscontrando una riduzione dei sintomi vasomotori e delle vampate di calore, senza compromissione della massa ossea né degli effetti terapeutici dei GnRH-a. Il meccanismo alla base del mancato effetto stimolatorio del tibolone sull'utero fibromatoso non è ancora completamente compreso. Recentemente, uno studio in vivo (46) ha dimostrato, in miomi uterini ottenuti dopo terapia prechirurgica con GnRH-a e tibolone, una riduzione della proliferazione cellulare ed un incremento dell'apoptosi, mentre in caso di terapia con i soli GnRH-a questi parametri non risultavano significativamente modificati rispetto ai leiomiomi ottenuti da pazienti non trattate.

*Terapia medica: gli antagonisti del GnRH.* Recentemente, è stato sperimentato l'utilizzo del ganirelix, un antagonista del GnRH, nella terapia prechirurgica della fibromatosi uterina (47). Alla luce dei risultati ottenuti, gli antagonisti del GnRH, rispetto agli agonisti, sembrano determinare una più rapida riduzione del volume dell'utero e dei fibromi, con conseguente riduzione della durata del trattamento e minore incidenza di effetti collaterali indesiderati di tipo simil-menopausale.

*Nuove strategie terapeutiche: embolizzazione dell'arteria uterina.* Il riconoscimento del ruolo fondamentale della vascolarizzazione nell'accrescimento dei fibromi uterini è alla base dell'embolizzazione dell'arteria uterina, tecnica interventistica radiologica finalizzata a privare il fibroma della sua rete vascolare. Tale procedura conservativa richiede la cateterizzazione di entrambe le arterie uterine per instillarvi microparticelle di alcool polivinilico, che occludono in maniera permanente i rami arteriosi diretti al mioma (48).

Studi recenti dimostrano come questo intervento sia associato ad un significativo miglioramento della qualità di vita e dei sintomi correlati alla presenza dei miomi (49). Le complicanze secondarie alla modalità di

esecuzione della tecnica sono rare, con una frequenza ulteriormente ridotta dal grado di esperienza dell'operatore. Circa il 7% delle pazienti, soprattutto con fibromi di notevoli dimensioni, lamenta un senso di pesantezza cronico dopo l'intervento di embolizzazione (50). Le pazienti, inoltre, possono lamentare una cosiddetta "sindrome post-embolizzazione", caratterizzata da sintomi simil-influenzali, febbre elevata, leucocitosi, senso di malessere, dovuta al rilascio di citochine da parte dei tessuti ischemici. Complicanze infettive severe, soprattutto in fibromi di grosse dimensioni, si verificano nell'1-2% dei casi, spesso a mesi di distanza dall'intervento, e possono esitare in isterectomia (51, 52). Non esistono ancora in letteratura studi randomizzati controllati che confrontino gli effetti e le complicanze dell'embolizzazione dell'arteria uterina con quelli delle terapie convenzionali.

*La fibromatosi uterina: effetti della terapia medica pre-chirurgica della fibromatosi uterina sull'angiogenesi, la proliferazione cellulare, l'apoptosi dei leiomiomi uterini.*

*Angiogenesi e growth factors angiogenetici.* Come precedentemente accennato, un adeguato apporto vascolare è fondamentale per l'accrescimento dei leiomiomi uterini. Molti Autori hanno studiato la distribuzione dei vasi sanguigni nei leiomiomi, spesso confrontandola con quella del miometrio sano circostante. I dati più recenti (23) indicano che i miomi, soprattutto quelli di dimensioni maggiori, sono circondati da una "capsula vascolare" estremamente densa, che fornisce l'apporto ematico fondamentale per l'accrescimento. È ipotizzabile che, durante lo sviluppo dei leiomiomi, i vasi sanguigni preesistenti vadano incontro a regressione e vasi neoformati invadano la lesione dalla periferia. La formazione di tali vasi è dovuta ad un processo di angiogenesi che, a differenza della vasculogenesi, è attiva non solo durante il periodo embrionale, ma anche nella vita adulta.

In condizioni fisiologiche, l'angiogenesi si realizza durante i processi di cicatrizzazione delle ferite e nell'apparato genitale femminile durante la vita fertile (53).

In condizioni patologiche, invece, l'angiogenesi riveste un ruolo rilevante nei processi infiammatori cronici (54), nella formazione di circoli collaterali in caso di malattie angioproliferative (55) e nella vascolarizzazione dei tumori maligni e benigni, tra cui i leiomiomi uterini.

Qualsiasi processo angiogenetico, sia fisiologico che patologico, ha inizio con l'attivazione delle cellule endoteliali in seguito al rilascio di citochine indotto da una condizione di ipossia o ischemia. Perché si abbia la formazione di nuovi capillari, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni preesistenti devono degradare la membrana basale ed invadere lo stroma adiacente. Questi processi richiedono l'azione combinata dell'attivatore del plasminogeno (PA, plasminogen activator) e delle metalloproteinasi della matrice (MMPs, matrix metallo-proteinases). L'attivatore del plasminogeno tipo-urokinasi (u-PA, urokinase-type plasminogen activator) e l'attivatore del plasminogeno tissutale (t-PA, tissue-type plasminogen activator) sono proteasi sieriche che convertono il plasminogeno in plasmina. La plasmina degrada diversi componenti della matrice extracellulare (ECM, extracellular matrix), quali fibrina, fibronectina, laminina, proteine core di proteoglicani, e attiva le metalloproteinasi MMP-1, MMP-3 e MMP-9, che degradano la membrana basale.

L'attività del PA e delle MMPs è controllata a 3 livelli:

1) l'espressione di PA e MMPs è indotta da fattori di crescita angiogenetici e citochine;

2) essi sono secreti come zimogeni e quindi attivati proteoliticamente nella ECM;

3) l'attività del PA, delle MMPs e della plasmina è regolata rispettivamente dall'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI, plasminogen activator inhibitor), dall'inibitore tissutale delle MMPs (TIMP) e dall' $\alpha_2$ -antiplasmina.

PA e MMPs sono secreti insieme ai loro inibitori, in un equilibrio che consente il controllo rigoroso dell'attività proteolitica locale e, quindi, la protezione della normale struttura tissutale. Tale regolazione si perde durante la crescita tumorale e la metastatizzazione.

In seguito della degradazione proteolitica della ECM, le cellule endoteliali "leader" migrano attraverso la matrice degradata e poi proliferano per effetto della stimolazione da parte di alcuni fattori di crescita che, oltre alla migrazione, controllano anche la differenziazione delle cellule endoteliali. L'ultima tappa della angiogenesi è la formazione di strutture capillari tubulari e la loro successiva stabilizzazione.

I leiomiomi uterini, come precedentemente descritto, sono caratterizzati da una proliferazione vascolare particolarmente intensa alla periferia delle singole lesioni, da cui poi si dipartono i rami vascolari che forniscono il giusto apporto ematico alla neoplasia. Una disregolazione locale dell'attività dei fattori di crescita angiogenetici e dei loro recettori è stata ipotizzata nella fibromatosi uterina (24). Tra i fattori di crescita implicati nella regolazione della differenziazione delle cellule epiteliali e nell'angiogenesi, il PDGF, il bFGF e il VEGF sono quelli maggiormente attivi nell'utero fibromatoso.

Il PDGF è immagazzinato nei granuli  $\alpha$  delle piastrine, che lo rilasciano in seguito ad attivazione. Può anche essere prodotto da altri tipi cellulari, tra cui macrofagi attivati, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce e molti tipi di cellule tumorali. Il PDGF è un fattore di crescita dimerico, derivante dalla combinazione di due catene peptidiche (A e B) in omo- o etero-dimeri (56). Sono noti due recettori per il PDGF: PDGFR- $\alpha$ , che può legare tutti i dimeri (AA, AB, BB) e PDGFR- $\beta$ , che lega ad alta affinità solo l'omodimero BB. Entrambi i recettori sono tirosin-chinasi. In seguito all'interazione con il ligando, formano omo- ( $\alpha$ - $\alpha$ ;  $\beta$ - $\beta$ ) o etero- ( $\alpha$ - $\beta$ ) dimeri e si autofosforilano su residui tirosinici (57). Il PDGF è mitogeno e chemiotattico per le fibrocellule muscolari lisce miometriali e i fibroblasti.

Recentemente, studi in vitro e in vivo (18, 19) hanno dimostrato che il PDGF è fondamentale per la risposta mitogena dei leiomiomi alla stimolazione estrogenica e che l'immuno-espressione di questo fattore di crescita è correlabile alle modifiche nel volume uterino osservate dopo terapia con GnRH-a. La sua espressione è stata dimostrata anche nel citoplasma delle fibrocellule muscolari lisce dei vasi sanguigni del miometrio e dei leiomiomi (58). A livello vascolare, il PDGF è in grado di stimolare l'angiogenesi e può anche modificare il calibro dei vasi sanguigni (23). Inoltre, il PDGF può stimolare la secrezione di VEGF da parte delle cellule muscolari lisce: il VEGF così prodotto a sua volta stimola l'organizzazione delle cellule endoteliali in strutture tubulari simil-vascolari (59).

Il bFGF, anch'esso, come il PDGF, fattore di crescita ad alta affinità per l'eparina, appartiene ad una famiglia composta da 19 proteine che, attraverso l'interazione con la matrice extracellulare, modulano i processi di differenziazione nell'embriogenesi e di progressione della crescita tumorale. Gli effetti del bFGF sulle cellule sono mediati dal legame con un recettore tirosin-chinasi ad alta affinità (FGFR). L'interazione con il ligando è seguita dalla dimerizzazione del recettore e dalla sua autofosforilazione. Nella ECM,

il bFGF è immagazzinato in forma inattiva legato ai proteoglicani e all'eparina solfato ed è rilasciato in seguito a degradazione proteolitica della ECM (60). Il bFGF è mitogeno per le fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi uterini (61) e per le cellule endoteliali (22), regola la migrazione di queste ultime (22) ed induce la produzione di enzimi per il rimodellamento della ECM, come collagenasi e attivatore del plasminogeno (22, 62). Il bFGF agisce sinergicamente al VEGF e ne stimola la sintesi in numerose linee cellulari tumorali (63, 64). È riportata, in letteratura, una ridotta espressione di bFGF nelle cellule muscolari lisce dei leiomiomi dopo trattamento con GnRH-a (21, 40).

Il VEGF è un fattore di crescita dimerico ad alta affinità di legame per l'eparina, esistente in quattro diverse isoforme, di cui la più attiva è quella a 165 amminoacidi (65). Sono conosciuti due recettori della famiglia delle tirosin-chinasi per il VEGF: Flt-1, recettore con maggiore affinità, espresso dalle cellule endoteliali vascolari (66) e KDR, recettore con minore affinità, identificato su cellule endoteliali, tumorali e monociti (67). L'interazione con entrambi i recettori è essenziale per indurre lo spettro completo di risposte biologiche al VEGF. In seguito al legame con il VEGF, i recettori vanno incontro ad autofosforilazione e ad omo- o etero-dimerizzazione; quindi, si

attiva una cascata di fosforilazioni che porta all'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale. I due recettori attivano vie di trasduzione distinte, trasmettendo segnali diversi alle cellule endoteliali. Mentre l'interazione del VEGF con l'eterodimero flk-1/KDR attiva la proliferazione delle cellule endoteliali, nessun effetto mitogeno segue il legame del VEGF al recettore Flt-1 che, pertanto, potrebbe fungere da regolatore negativo della traduzione del segnale dipendente dall'interazione tra VEGF e recettore KDR (68). Un ruolo rilevante nella regolazione dell'espressione del gene per il VEGF è sostenuto dalla tensione tissutale di ossigeno (69). Il VEGF è un mediatore fondamentale dell'angiogenesi. Esso non è mitogeno per le fibrocellule muscolari lisce (70), ma sostiene l'accrescimento dei leiomiomi uterini attraverso la creazione di un adeguato supporto vascolare (71). Esso, infatti, stimola la migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali, modula l'espressione di enzimi di rimodellamento della ECM e aumenta la permeabilità vascolare, fondamentale per l'inizio del processo angiogenetico (72, 73).

In un recente studio (74), abbiamo riportato una significativa riduzione della immunoreattività per PDGF, bFGF e VEGF nelle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi dopo pretrattamento con GnRH-a e GnRH-a e tibolone. Nello stesso studio, abbiamo osservato una forte immunoreattività vascolare

per PDGF, bFGF e VEGF, sia nelle cellule endoteliali che nelle cellule muscolari lisce, in accordo con quanto già riportato in letteratura (20, 70, 75). Nei leiomiomi trattati è stata osservata una immunoreattività vascolare altrettanto spiccata. Tale persistenza potrebbe essere interpretata come una riserva vascolare di fattori di crescita angiogenetici ed essere una possibile spiegazione per la rapida ricrescita dei leiomiomi uterini al termine della somministrazione di GnRH-a. Per quanto riguarda il pattern vascolare, i leiomiomi trattati presentavano una prevalenza di vasi scarsamente ramificati, per lo più capillari, con una significativa riduzione dell'espressione immunoistochimica di CD34. Anche l'angiogenesi, rappresentata dalla positività vascolare per CD105, si è ridotta significativamente dopo terapia prechirurgica.

*Proliferazione cellulare e apoptosi.* Come già precedentemente accennato, l'esatto meccanismo attraverso cui i GnRH-a determinano la riduzione di volume dell'utero e dei leiomiomi non è stato ancora completamente compreso. È stato ipotizzato un effetto sulla proliferazione cellulare e l'apoptosi, ma i dati presenti in letteratura sono ancora contrastanti.

In particolare, studi che riportano valutazioni effettuate su esami istologici di routine non hanno evidenziato modifiche nella proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi dopo somministrazione di GnRH-a (76).

D'altra parte, alcuni Autori riportano una ridotta espressione di Ki67 e/o PCNa, che identificano la quota di cellule proliferanti (39, 41), altri, invece, riferiscono un'aumentata espressione dei due antigeni dopo terapia pre-chirurgica con GnRH-a (77).

Riguardo all'apoptosi, numerosi studi riportano una elevata espressione dell'inibitore dell'apoptosi Bcl-2, che controlla la sopravvivenza e la morte cellulare, sia in leiomiomi uterini non trattati che in quelli pre-trattati con GnRH-a (39, 77, 78, 79, 80).

In un recente studio (46), abbiamo riportato una riduzione nell'espressione immunohistochimica di PCNA dopo pre-trattamento con GnRH-a, ma senza differenze statisticamente significative con i leiomiomi di controllo.

Per quanto riguarda gli effetti del tibolone, i dati più approfonditi riguardano gli effetti di questo farmaco sulle cellule epiteliali mammarie, in caso di terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa. In questi casi, è

riportato un decremento della proliferazione cellulare (riduzione dell'espressione di Ki67), associato ad un incremento dell'apoptosi (ridotta espressione di Bcl-2) (81, 82).

Nell'endometrio, sempre in età post-menopausale, non sono state descritte differenze significative nel tasso di apoptosi prima e dopo somministrazione di tibolone (83).

Per quanto riguarda gli effetti del tibolone sui leiomiomi uterini, studi clinici riportano che la somministrazione di questo farmaco come agente add-back in associazione ai GnRH-a nella terapia pre-chirurgica di pazienti in età pre-menopausale, non modifica le dimensioni dei fibromi uterini preesistenti (84). Al contrario, la terapia ormonale sostitutiva classica della post-menopausa sembra incrementare il volume dei fibromi uterini (85).

A proposito degli effetti specifici del tibolone sulla proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi, recentemente abbiamo dimostrato (46), per la prima volta in letteratura, una riduzione significativa dell'espressione di PCNA in leiomiomi trattati con GnRH-a e tibolone, rispetto a leiomiomi non trattati o trattati con i soli GnRH-a. Ciò suggerisce un effetto inibitorio dell'associazione GnRH-a e tibolone sulla proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi.

Nello studio precedentemente citato (46), abbiamo confermato l'assenza di effetto dei GnRH-a sull'apoptosi, riportando, al contrario, un effetto proapoptotico (ridotta espressione di Bcl-2) dell'associazione GnRH-a e tibolone, ipotizzando sui fibromi uterini, analogamente a quanto già riportato in letteratura per le cellule mammarie, un effetto proapoptotico del tibolone.

## **Terapia prechirurgica della fibromatosi uterina: aspetti clinici ed espressione del Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 e del Connective Tissue Growth Factor.**

La particolare abbondanza di tessuto connettivo e matrice extracellulare (ECM) è una caratteristica distintiva dei leiomiomi uterini. La ECM sembra svolgere un ruolo dinamico nell'accrescimento dei leiomiomi uterini, non solo influenzando la proliferazione e il differenziamento cellulare, ma anche fungendo da deposito di fattori di crescita biologicamente attivi, che a loro volta possono essere implicati nell'accrescimento dei leiomiomi (86).

Il Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), un polipeptide dimerico di 112 kDa esistente in tre isoforme, è probabilmente il fattore di crescita più studiato negli ultimi anni nell'ambito della fibromatosi uterina. Esso è fondamentale nella eziopatogenesi di numerosi processi fibrotici, in quanto induce la sintesi di numerosi componenti della ECM che, a loro volta, inducono la fibrosi (87). Nei leiomiomi uterini, il TGF- $\beta$  sembra avere un ruolo nel promuovere la sintesi di fibronectina e collagene (87, 88, 89). L'isoforma 3 del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 3) è la dominante nelle cellule di origine

mesenchimale, incluse le fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi (90). È stata dimostrata una up-regulation dell'espressione di questa isoforma in campioni di leiomioma per effetto dell'azione del progesterone (91). Inoltre, la più intensa espressione di TGF- $\beta$ 3 nei leiomiomi rispetto al miometrio conferma l'ipotesi di un ruolo patogenetico di questo fattore di crescita nella fibromatosi uterina (91).

La somministrazione di GnRH-a determina una riduzione di volume dei leiomiomi, unitamente ad una riduzione dell'apporto ematico, della cellularità e dell'estensione della ECM. In fibrocellule muscolari di miometrio esposte ai GnRH-a è stata riscontrata una ridotta espressione di TGF- $\beta$  (92). In leiomiomi uterini esaminati dopo trattamento con GnRH-a è stato osservato un incremento nella degradazione della ECM (93) e una riduzione nella sintesi di TGF- $\beta$  (92) e TGF- $\beta$ 3 (94). Questo dato potrebbe dipendere dal fatto che l'espressione delle isoforme del TGF- $\beta$  nei fibromi uterine è sotto il controllo degli steroidi ovarici (92, 94), anche se è stato ipotizzato un ruolo diretto dei GnRH-a (92). Non esistono, invece, evidenze sperimentali circa gli effetti del tibolone da solo o in associazione con i GnRH-a sull'espressione di TGF- $\beta$  nel miometrio o nei leiomiomi uterini.

Gli effetti del TGF- $\beta$  sembrano essere mediati, almeno in parte, da altre molecole. Una di queste è il Connective tissue growth factor (CTGF), uno dei regolatori della cascata di eventi innescata dal TGF- $\beta$  durante i processi di cicatrizzazione (95). Nelle cellule muscolari lisce delle vie aeree, è stata dimostrata una up-regulation dell'espressione del CTGF da parte del TGF- $\beta$ 1 (96). Il CTGF è una molecola di 38kDa, appartenente alla famiglia "CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH)" (97), prodotto dalle cellule endoteliali in coltura (98). Esso è coinvolto nella riparazione e rigenerazione tissutale, attraverso la stimolazione della proliferazione cellulare, della chemiotassi, dell'adesione cellulare e della formazione di ECM (95, 99). Livelli elevati di CTGF sono stati osservati in numerose condizioni patologiche, come lo sclerodermia (100), l'aterosclerosi (101), la fibrosi polmonare (102), la fibrosi renale (103) ed alcune patologie proliferative benigne dei tessuti mesenchimali (104).

Le evidenze sperimentali dell'espressione di CTGF nel miometrio e nei leiomiomi uterini sono ancora scarse. L'espressione di CTGF è stata dimostrata nelle cellule endoteliali vascolari del miometrio e dei leiomiomi (105) e, recentemente, è stata osservata una ridotta espressione del gene per il CTGF nei leiomiomi uterini rispetto al miometrio (106). Non sono

riportati, invece, dati relativi agli effetti della terapia con GnRH-a, associati o meno al tibolone, sull'espressione di CTGF nei leiomiomi uterini e nel miometrio.

Obiettivo clinico di questo braccio dello studio è la valutazione dell'efficacia della terapia pre-chirurgica a breve termine della fibromatosi uterina con GnRH-a e tibolone sulla sintomatologia e sul volume uterino. Inoltre, si valuteranno le differenze registrate tra le pazienti trattate con i soli GnRH-a e quelle trattate anche con tibolone relativamente agli effetti collaterali indesiderati di tipo climaterico.

Il secondo obiettivo è la valutazione immunohistochimica dell'espressione di TGF- $\beta$ 3 e, per la prima volta in letteratura, di CTGF nei leiomiomi uterini e nel miometrio di pazienti non trattate e di pazienti trattate con GnRH-a associati o meno al tibolone, allo scopo di determinare gli effetti di tali terapie sui fattori di crescita profibrotici. Inoltre, si valuteranno le eventuali ulteriori modifiche dell'espressione immunohistochimica dei fattori di crescita studiati indotte dalla terapia add-back con tibolone rispetto a quanto osservato con i soli GnRH-a.

I dati ottenuti potranno fornire nuove indicazioni circa il ruolo patogenetico dei growth factors profibrotici nella fibromatosi uterina e

contribuire anche ad approfondire lo studio dei meccanismi con cui gli analoghi del GnRH determinano la riduzione del volume dell'utero e dei fibromi.

### *Materiali e metodi*

Lo studio è stato condotto presso il Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione dell'Università "Federico II" di Napoli su 45 donne in età premenopausale candidate ad intervento chirurgico per fibromatosi uterina sintomatica. Tutte le pazienti hanno dato il loro consenso informato per prendere parte allo studio, che è stato realizzato in accordo con le linee-guida istituzionali del Comitato Etico.

Le pazienti sono state casualmente divise in due gruppi.

23 pazienti (gruppo GnRH-a) (età  $41.2 \pm 3.5$  [SD]; parità  $2.7 \pm 1.9$  [SD]; BMI  $24.7 \pm 5.6$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>) sono state trattate con un'iniezione sottocutanea mensile di leuprolide acetato depot 3.75 mg.

22 pazienti (gruppo GnRH-a e tibolone) (età  $39.7 \pm 3.8$  [SD]; parità  $2.8 \pm 1.6$  [SD]; BMI  $25.3 \pm 4.9$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>) hanno ricevuto la stessa terapia, con l'aggiunta di 2.5 mg di tibolone al giorno, per via orale, fino al giorno precedente l'intervento chirurgico. La somministrazione di tibolone è stata iniziata 15 giorni dopo la prima fiala di leuprolide acetato, in quanto le vampate di calore cominciano a manifestarsi circa 20 giorni dopo la prima somministrazione di GnRH-a (107).

Entro tre settimane dall'ultima somministrazione di leuprolide acetato, le pazienti sono state sottoposte ad intervento chirurgico.

22 donne in età premenopausale (gruppo non trattato) (età  $40.6 \pm 3.8$  [SD]; parità  $2.5 \pm 1.3$  [SD]; BMI  $24.9 \pm 5.1$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>) non hanno assunto GnRH-a e sono state direttamente sottoposte ad intervento chirurgico durante la fase follicolare del ciclo mestruale. Le caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche dei leiomiomi ottenuti da tali pazienti sono state confrontate con quelle dei leiomiomi ottenuti dalle pazienti trattate.

Nessuna delle pazienti incluse nello studio aveva effettuato terapie ormonali, aveva partorito o si era sottoposta ad interventi chirurgici sull'utero nell'anno precedente lo studio, né presentava neoplasie maligne.

All'inizio dello studio, tutte le pazienti sono state sottoposte a visita ginecologica, ecografia transaddominale, esami ematologici di routine (compresi i livelli di emoglobina e di sideremia) e misurazione della densità minerale ossea (BMD). In tutti i casi, l'ecografia è stata effettuata dallo stesso operatore esperto utilizzando l'ecografo Toshiba PowerVision 8000 (Toshiba Medical Systems, Roma, Italia). Il volume uterino è stato calcolato misurando i tre diametri ( $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$ ) e quindi applicando la formula dell'ellissoide ( $D_1 \times D_2 \times D_3 \times 4/3 \times 0.53 \times \pi$ ). La BMD del tratto vertebrale lombare (L2-L4) è

stata determinata con una scansione anteroposteriore utilizzando l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (Dexa QDR 1000; Hologic, Waltham, MA). Il contenuto minerale osseo (g/cm) è stato diviso per lo spessore osseo (cm) ottenendo un indice (g/cm<sup>2</sup>) utilizzato per standardizzare i risultati ottenuti in relazione alle dimensioni ossee. I dati sono stati analizzati tutti dallo stesso operatore.

I sintomi correlati alla presenza dei leiomiomi (menorragia, algie pelviche) sono stati valutati mediante una scala analogica visiva da 0 a 10. Le pazienti trattate hanno tenuto un diario quotidiano del numero di vampate di calore.

I test clinici e di laboratorio sono stati ripetuti dopo la terapia medica. In ogni caso, sono stati effettuati in cieco rispetto al tipo di trattamento effettuato dalla paziente (GnRH-a oppure GnRH-a e tibolone).

Le pazienti sono state quindi sottoposte a miomectomia o ad isterectomia.

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata su sezioni seriali di 5 µm ciascuna ottenute da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina di leiomiomi e, quando disponibile, di miometrio adiacente. I campioni di miometrio normale sono stati prelevati da tessuto miometriale distante almeno

0.5 cm dal mioma (nella maggior parte dei casi, la distanza era di 1 cm): questa procedura consente di escludere la pseudocapsula dei miomi da ogni campionamento di miometrio.

Le sezioni sono state trattate con la tecnica di estrazione antigenica indotta dal calore mediante incubazione in forno a microonde a 650 W (tre passaggi sequenziali di quattro minuti ciascuno, in soluzione di citrato a 10 mM - pH 6.0), per lo smascheramento dell'antigene, e poi incubate per venti minuti a temperatura ambiente con 0.3% di perossido di idrogeno in metanolo, per attenuare la perossidasi endogena. Per prevenire l'immunocolorazione aspecifica è stata eseguita un'ulteriore incubazione con siero di topo non immune (1:20, Dakopatts, Hamburg, Germania) diluito in PBS-albumina sierica bovina (1%) per 25 minuti. Dopo tre lavaggi con TRIS-soluzione salina, le sezioni sono state incubate per una notte a 4°C, in camera umida, con i seguenti anticorpi primari: anti-TGF- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3, policlonale, sc-82, Santa Cruz Biochemistry, 1:250) e anti-CTGF (CTGF, policlonale, sc-14939, Santa Cruz Biochemistry, 1:250).

La valutazione dell'immunocolorazione è stata effettuata dopo incubazioni sequenziali di 20 minuti con anticorpi legati a biotina e streptavidina marcata con perossidasi (LSAB-HRP, Dako, Italia). Come

soluzione di substrato cromogeno è stata utilizzata la 3,3 diaminobenzidina (DAB, Laboratori Vector, Burlingame, CA) con lo 0.3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo la colorazione nucleare con ematossilina, le sezioni sono state montate con mezzo sintetico (Entellan, Merck, Darmstadt, Germania).

I controlli positivi per l'espressione dei due anticorpi testati sono stati eseguiti su tessuto uterino normale per il TGF- $\beta$ 3 e su tessuto connettivo della fase iniziale della cicatrizzazione per il CTGF. I controlli negativi sono stati effettuati sugli stessi tessuti utilizzando un siero non specifico non immune invece degli anticorpi primari.

La colorazione immunohistochimica è stata valutata separatamente da due osservatori, in cieco rispetto ai dati clinici delle pazienti.

Sono stati selezionati in maniera casuale almeno 10 campi ad alto ingrandimento da aree rappresentative dei campioni di leiomiomi, cinque dalla periferia e cinque dalla regione centrale, e di miometrio.

Per ciascun anticorpo utilizzato, sono state considerate positive soltanto le cellule con una ben definita colorazione marrone del citoplasma. L'espressione immunohistochimica è stata quantificata utilizzando un metodo semiquantitativo: per ciascun caso, il numero di fibrocellule muscolari lisce positive è stato espresso come percentuale di cellule colorate sul totale delle

cellule presenti nei 10 campi. Quindi, ciascun caso è stato assegnato ad una delle seguenti categorie arbitrariamente determinate: + ( $\leq 30\%$  di cellule positive); ++ ( $>30-50\%$ ); +++ ( $>50-70\%$ ); ++++ ( $>70\%$ ). In ogni caso, la valutazione immunohistochimica è stata effettuata senza conoscere i dati clinici relativi alle pazienti.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test  $t$  di Student per paragonare le variabili parametriche ed il test  $U$  di Mann-Whitney per paragonare le variabili non parametriche. Il livello di significatività statistica è stato posto per valori di  $p < 0.05$ .

Per valutare il grado di accordo intra- ed interosservatori è stato calcolato il coefficiente  $k$ .

## *Risultati*

Tutte le pazienti hanno completato lo studio.

I livelli di emoglobina e sideremia sono significativamente aumentati dopo la terapia medica, senza differenze significative tra i due gruppi trattati (tabella 1).

La BMD si è significativamente ridotta dopo terapia medica nel gruppo GnRH-a, rispetto ai valori di partenza ( $p < 0.05$ ). Nel gruppo GnRH-a e tibolone, non è stata osservata alcuna riduzione significativa dopo la terapia rispetto ai valori di partenza (tabella 1).

Il volume uterino si è significativamente ridotto dopo terapia medica ( $p < 0.05$ ), senza differenze significative tra i due gruppi trattati (tabella 1). Abbiamo osservato una riduzione del volume uterino del 56.6% nel gruppo GnRH-a e del 55.4% nel gruppo GnRH-a e tibolone. Due pazienti del gruppo GnRH-a ed una del gruppo GnRH-a e tibolone hanno mostrato un decremento del volume uterino inferiore al 10%. Queste pazienti sono state definite “non responders”.

I sintomi correlati alla presenza dei leiomiomi, espressi come media dei punteggi della scala visiva per ciascun sintomo  $\pm$  deviazione standard, sono

risultati simili in entrambi i gruppi all'inizio dello studio. Nessuna delle pazienti lamentava menorragia o algie pelviche al termine del trattamento (tabella 1).

**Tabella 1.** Volume uterino, parametri ematochimici, menorragia e dolore pelvico prima e dopo terapia medica (media  $\pm$  DS)

Caratteristiche	Gruppo non trattato	Gruppo GnRH-a			Gruppo GnRH-a e tibolone		
		<i>Prima della terapia</i>	<i>Dopo la terapia</i>	<i>p</i>	<i>Prima della terapia</i>	<i>Dopo la terapia</i>	<i>p</i>
<b>Volume uterino (cm<sup>3</sup>)</b>	803.2 $\pm$ 198.2	828.9 $\pm$ 172.5	469.1 $\pm$ 127.9	<.05	799.3 $\pm$ 180.1	443.1 $\pm$ 131.5	<.05
<b>BMD (g/cm<sup>2</sup>)</b>	-	1.042 $\pm$ 0.039	1.008 $\pm$ 0.048	<.05	1.038 $\pm$ 0.035	1.033 $\pm$ 0.029	NS
<b>Emoglobinemia (g/dL)</b>	9.1 $\pm$ 1.8	9.8 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 1.8	<.05	9.3 $\pm$ 1.9	12.1 $\pm$ 1.6	<.05
<b>Sideremia (<math>\mu</math>g/dL)</b>	42.8 $\pm$ 7.1	39.7 $\pm$ 7.4	78.5 $\pm$ 5.2	<.05	41.7 $\pm$ 6.9	80.1 $\pm$ 4.7	<.05
<b>Menorragia*</b>	8.1 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 1.1	-	-	7.3 $\pm$ 1.4	-	-
<b>Dolore pelvico*</b>	4.7 $\pm$ 1.5	4.9 $\pm$ 1.3	-	-	5.1 $\pm$ 1.1	-	-

NS = non significativo

\* Calcolato utilizzando una scala analogica visiva da 0 a 10

Il numero di vampate di calore è aumentato dopo il primo mese di terapia nelle pazienti del gruppo GnRH-a. Nel gruppo GnRH-a e tibolone, invece, il numero medio di vampate di calore è rimasto relativamente costante a partire dal secondo mese ed è risultato significativamente più basso rispetto al gruppo GnRH-a (figura 1).

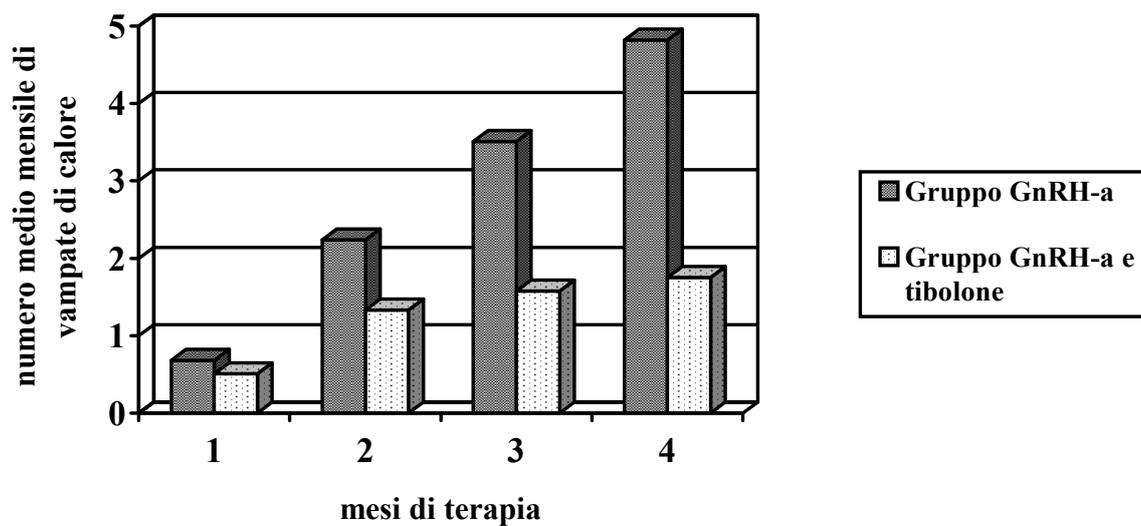
Tra le pazienti non trattate, 8 sono state sottoposte a laparoisterectomia totale, 1 ad isterectomia laparoscopica, 10 a miomectomia laparotomica e 3 a miomectomia laparoscopica. Delle pazienti trattate con GnRH-a, 3 sono state sottoposte a laparoisterectomia totale, 3 ad isterectomia laparoscopica, 10 a miomectomia laparotomica e 7 a miomectomia laparoscopica. Nel gruppo GnRH-a e tibolone, 3 pazienti sono state sottoposte a laparoisterectomia totale, 1 ad isterectomia laparoscopica, 12 a miomectomia laparotomica e 6 a miomectomia laparoscopica.

I campioni di miometrio sono stati ottenuti dalle pazienti isterectomizzate: 9 pazienti non trattate, 6 trattate con GnRH-a e 4 trattate con GnRH-a e tibolone.

I leiomiomi ottenuti durante l'intervento chirurgico erano costituiti da fasci incrociati di cellule muscolari lisce con un contenuto variabile di

fibroblasti e vasi sanguigni, con aree sparse di ialinizzazione, definite come collagene acellulare con nuclei scarsi o assenti.

**Figura 1.** Numero medio mensile di vampate di calore nelle pazienti trattate con GnRH-a e con GnRH-a e tibolone.



Nelle lesioni non trattate, l'analisi immunohistochimica ha rivelato una positività per l'espressione di TGF- $\beta$ 3 (fig. 2a, 2b) e CTGF (fig. 3a, 3b) sia nelle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi che nelle cellule endoteliali, ma anche a livello del miometrio normale. Le fibrocellule muscolari dei leiomiomi mostravano una forte immunopositività per entrambi i fattori di crescita studiati, con valori compresi tra le categorie +++ e ++++ dello score semiquantitativo (tabella 2). Non sono state osservate differenze significative relativamente alla provenienza del campione (periferia o centro), ma le cellule positive per CTGF erano prevalentemente localizzate nelle regioni perivascolari, mentre l'immunopositività per il TGF-  $\beta$ 3 era più diffusa, anche lontano dai vasi sanguigni. Nel miometrio normale, è stata osservata una immunocolorazione quasi uniforme per entrambi gli anticorpi (fino al 50% delle fibrocellule muscolari), senza particolari restrizioni topografiche (es. nessun rinforzo del segnale nelle regioni perivascolari) e sempre con una bassa intensità di segnale. L'immunopositività per entrambi gli anticorpi è stata osservata anche nelle cellule endoteliali.

Le fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi trattati hanno mostrato una immunopositività significativamente inferiore ( $p < 0.05$ ) sia per il TGF-  $\beta$ 3 (fig. 2c, 2d) che per il CTGF (fig. 3c, 3d) rispetto alle lesioni non trattate, con

valori corrispondenti alle categorie + e ++ dello score semiquantitativo (tabella 2).

Non sono state osservate differenze significative tra i miomi trattati con GnRH-a e quelli trattati con GnRH-a e tibolone (tabella 2).

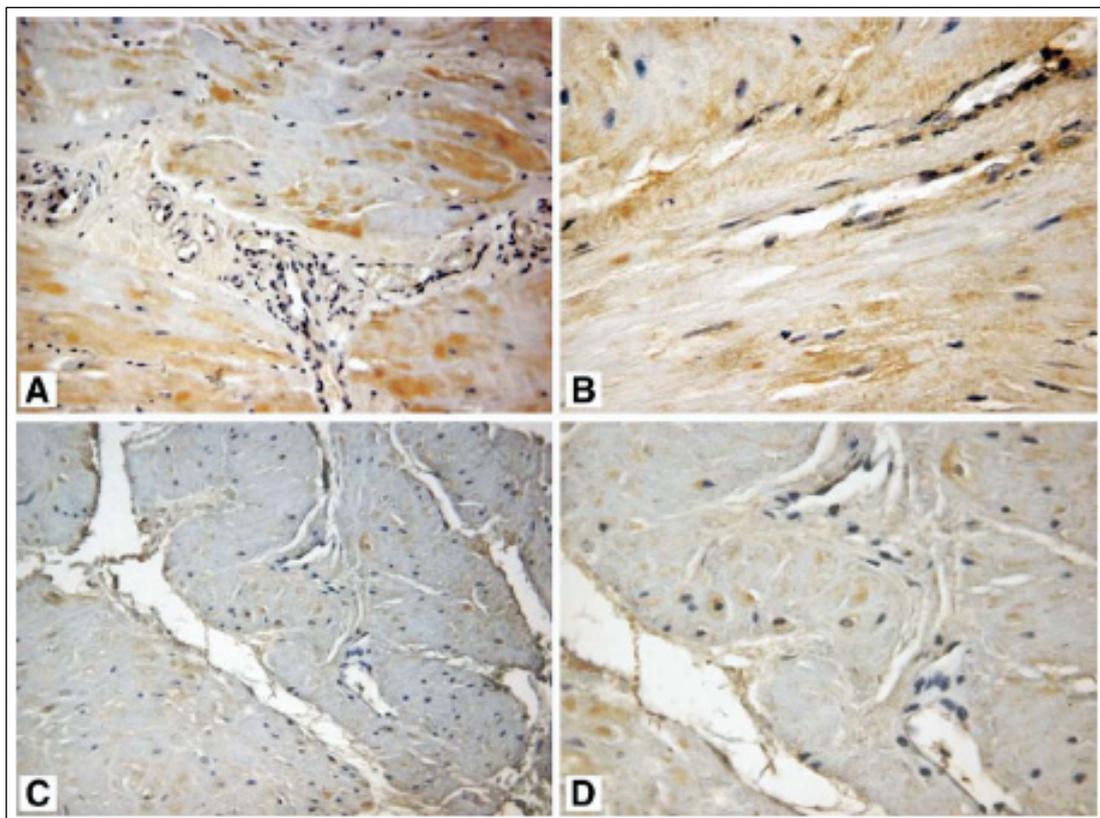
Abbiamo osservato una riduzione sia nel numero di cellule colorate che nell'intensità di colorazione. Non abbiamo rilevato differenze nel confronto tra la porzione centrale e quella periferica delle lesioni. L'immunopositività delle fibrocellule muscolari lisce e delle cellule endoteliali miometriali, è risultata simile a quanto osservato nei casi non trattati.

I risultati dell'immunoistochimica sui campioni ottenuti da pazienti non responders sono simili a quelli osservati nelle pazienti non trattate. Le fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi e del miometrio hanno mostrato una forte immunopositività, con uno score semiquantitativo di +++, sia per l'espressione di TGF- $\beta$ 3 che per quella di CTGF. Le cellule endoteliali sono risultate positive per entrambi gli anticorpi.

Il coefficiente k per la valutazione di tutti gli anticorpi testati nello studio è risultato 0.9 per l'accordo intraosservatore (accordo eccellente) e 0.85 per l'accordo interosservatori (accordo eccellente).

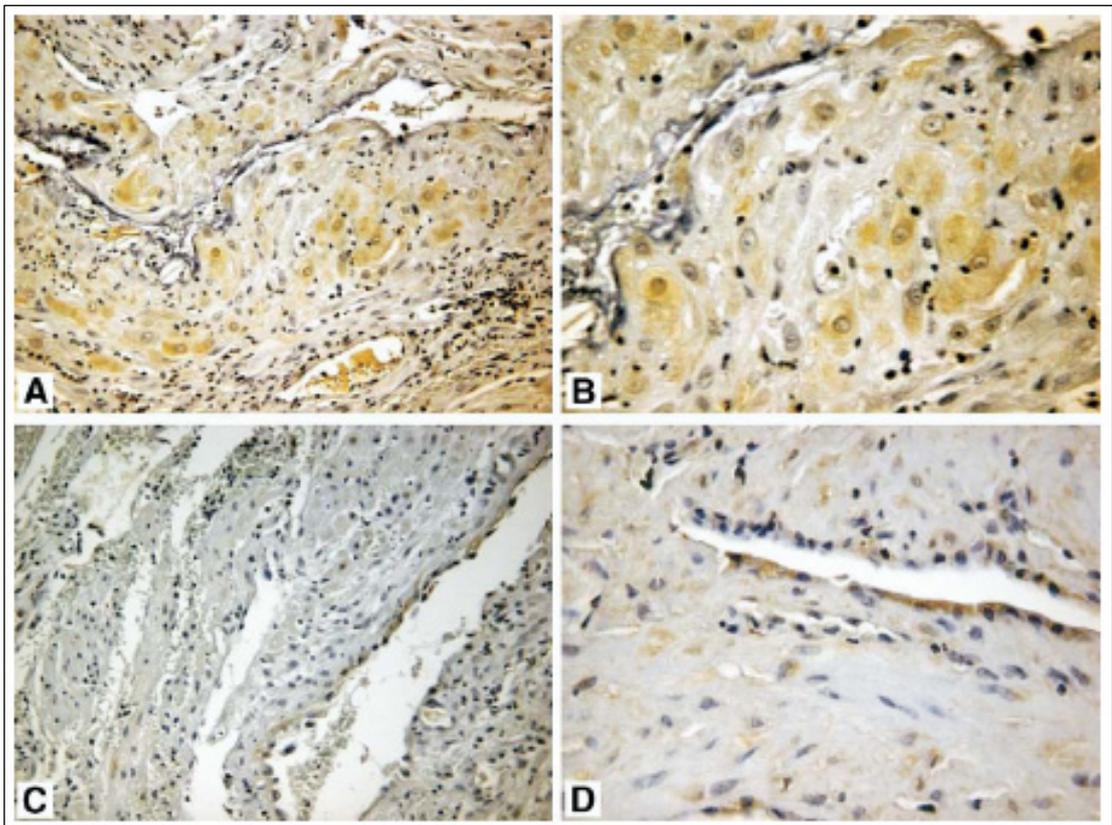
**Figura 2.**

**a)** Un caso di leiomioma non trattato, con ben definita immunopositività per anti-TGF- $\beta$ 3 in >25% delle cellule muscolari (LSAB,  $\times$ 106). **b)** Lo stesso caso, a maggiore ingrandimento (LSAB,  $\times$ 250). **c)** Un caso di leiomioma trattato, con bassa e focale immunopositività delle fibrocellule muscolari per anti-TGF- $\beta$ 3 (LSAB,  $\times$ 106). **d)** Lo stesso caso, a maggiore ingrandimento (LSAB,  $\times$ 250).



**Figura 3.**

**a)** Un caso di leiomioma non trattato, con ben definita immunopositività per anti-CTGF in >25% delle cellule muscolari (LSAB,  $\times 106$ ). **b)** Lo stesso caso, a maggiore ingrandimento (LSAB,  $\times 250$ ). **c)** Un caso di leiomioma trattato, con bassa e focale immunopositività delle fibrocellule muscolari per anti-CTGF (LSAB,  $\times 106$ ). **d)** Lo stesso caso, a maggiore ingrandimento (LSAB,  $\times 250$ ).



**Tabella 2.** Range dello score semiquantitativo per l'immunoexpressione di TGF- $\beta$ 3 e CTGF nel miometrio e nelle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi ottenuti da pazienti non trattate e da pazienti trattate con GnRH-a e GnRH-a più tibolone.

Growth Factors	Gruppo non trattato			Gruppo GnRH-a			Gruppo GnRH-a e tibolone		
	<i>Miometrio</i>	<i>Centro del mioma</i>	<i>Periferia del mioma</i>	<i>Miometrio</i>	<i>Centro del mioma</i>	<i>Periferia del mioma</i>	<i>Miometrio</i>	<i>Centro del mioma</i>	<i>Periferia del mioma</i>
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>	+ / +++	+++	+++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
<b>CTGF</b>	+ / +++	+++ / +++++	+++ / +++++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++

### *Discussione e conclusioni*

I dati riportati in questo braccio dello studio, confermano l'efficacia della terapia prechirurgica con GnRH-a nel controllo dei sintomi legati alla presenza dei miomi e dell'anemia e nel determinare una significativa riduzione delle dimensioni dell'utero. L'associazione del tibolone non ha modificato gli effetti terapeutici dei GnRH-a sui parametri ematochimici e sul volume uterino, ma ha determinato un significativo miglioramento dei sintomi simil-menopausali e non ha alterato la BMD, in accordo con altri dati della letteratura (107).

Si ritiene che l'azione dei GnRH-a sui leiomiomi uterine si estrinsechi attraverso una down-regulation della sintesi degli steroidi ovarici e modifiche della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e dell'espressione di numerosi fattori di crescita nelle fibrocellule dei leiomiomi e del miometrio (92). Queste modifiche sono mediate dallo stato ipoestrogenico indotto dalla somministrazione di GnRH-a, ma nel miometrio e nei leiomiomi sono anche stati descritti recettori per il GnRH a bassa affinità ed alta capacità (108), che hanno indotto alcuni Autori ad ipotizzare un ruolo diretto dei GnRH-a (92,94). Tuttavia, le dosi di GnRH-a

necessarie per ottenere alcuni effetti (es. l'effetto antiproliferativo) in vitro superano i livelli sierici necessari per sopprimere la funzione ovarica, probabilmente a causa della bassa affinità ed elevata capacità dei siti di legame per il GnRH (109). Inoltre, la cascata di segnali intracellulari alla base dell'azione diretta dei GnRH-a non è ancora ben conosciuta.

TGF- $\beta$  svolge un ruolo chiave nella regolazione della migrazione cellulare, della crescita e del differenziamento e nel turnover della ECM in numerose lesioni caratterizzate da una prevalente componente connettivale fibrosa.

Il TGF- $\beta$ 3 è l'isoforma dominante nelle fibrocellule muscolari lisce (90). Rispetto al miometrio sano circostante, i leiomiomi presentano una iperespressione di TGF- $\beta$ 3 (110).

Una ridotta espressione di TGF- $\beta$  nelle fibrocellule muscolari lisce del miometrio e dei leiomiomi è stata descritta in vitro come effetto dei GnRH-a (92). La riduzione del volume dei miomi uterini indotta dai GnRH-a è associata, in vivo, alla down regulation dell'espressione del TGF- $\beta$  e dei suoi recettori (94).

Il presente studio conferma, in pazienti non trattate, un'espressione di TGF- $\beta$ 3 più elevata nei leiomiomi che nel miometrio circostante. Dopo

terapia con GnRH-a o con GnRH-a e tibolone, invece, oltre ad una riduzione del volume uterino, abbiamo riscontrato un'espressione di TGF- $\beta$ 3 inalterata nel miometrio e più bassa nei leiomiomi rispetto ai casi non trattati. Queste osservazioni confermano che il TGF- $\beta$ 3 può svolgere un ruolo nella progressione dei miomi.

Nei leiomiomi uterini, il progesterone induce una up-regulation dell'espressione di TGF- $\beta$ 3, che a sua volta determina una riduzione nell'attività delle metalloproteinasi di matrice (MMPs), gli enzimi chiave nella degradazione della ECM, con conseguente incremento della produzione di ECM (91). La terapia con GnRH-a sembra determinare una significativa riduzione degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs) ed un incremento di mRNA per le MMP nei leiomiomi trattati rispetto ai non trattati (93). Pertanto, una down-regulation della sintesi di TGF- $\beta$ 3 indotta dai GnRH-a, con conseguente decremento nella produzione di ECM e riduzione della proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce, potrebbe essere tra i meccanismi implicati nella riduzione del volume uterino dopo terapia con GnRH-a. Una ridotta risposta tissutale e recettoriale ai GnRH-a potrebbe influenzare questa

down-regulation e fornire una possibile spiegazione alla scarsa riduzione del volume uterino osservata nelle pazienti non-responders.

Per la prima volta in letteratura, presentiamo dati relativi all'effetto della terapia add-back con tibolone sull'espressione di TGF- $\beta$ 3 nel miometrio e nei leiomiomi: non abbiamo osservato alcuna differenza significativa rispetto ai campioni ottenuti da pazienti trattate soltanto con GnRH-a. Questa potrebbe rappresentare un'ulteriore evidenza della sicurezza della somministrazione del tibolone come agente add-back in associazione ai GnRH-a, anche se i nostri dati dovrebbero essere confermati da studi condotti su leiomiomi trattati soltanto con tibolone.

Il CTGF, che subisce una up-regulation da parte del TGF- $\beta$  ed agisce sulle cellule endoteliali, i fibroblasti e le fibrocellule muscolari lisce, è in grado di stimolare la mitosi, la proliferazione cellulare e la produzione di ECM (98,99,111). Uzun et al (105) hanno dimostrato una immunoreattività per CTGF soltanto nelle cellule endoteliali dei leiomiomi uterini. Inoltre, è stata anche descritta una ridotta espressione del gene per il CTGF nei leiomiomi rispetto al miometrio (106).

In contrasto con quanto riportato dai suddetti Autori, abbiamo riscontrato una forte immunopositività per il CTGF sia nelle cellule

endoteliali che nelle fibrocellule muscolari lisce del miometrio e dei leiomiomi. Inoltre, nelle pazienti non trattate, l'espressione del CTGF nelle fibrocellule muscolari lisce è risultata più bassa nel miometrio che nei leiomiomi.

Per quanto riguarda le pazienti trattate, per la prima volta abbiamo studiato gli effetti della terapia medica prechirurgica sull'espressione immunohistochimica del CTGF nel miometrio e nei leiomiomi. L'immunopositività del miometrio è risultata immutata, mentre i leiomiomi hanno mostrato un numero significativamente ridotto di fibrocellule muscolari lisce positive, con debole immunocolorazione. Questo pattern, complessivamente simile a quello osservato per l'espressione di TGF- $\beta$ 3, potrebbe essere dovuto, almeno in parte, alla regolazione dell'attività del CTGF da parte del TGF- $\beta$ 3, come già osservato in altri tipi di tessuti (96).

Il CTGF potrebbe svolgere un ruolo nell'accrescimento dei leiomiomi uterini, probabilmente regolando la proliferazione cellulare e la produzione di ECM. Uzumcu et al (105), sulla base dell'immunoreattività delle cellule endoteliali dei leiomiomi per il CTGF, ha ipotizzato che il CTGF possa agire attraverso un pathway angiogenico per stimolare la

crescita e lo sviluppo dei leiomiomi. Nel nostro studio, abbiamo trovato una forte immunopositività per TGF- $\beta$ 3 e CTGF nelle cellule endoteliali vascolari, sia nei leiomiomi trattati che in quelli non trattati. Questo pattern, già osservato per altri fattori di crescita (40), potrebbe confermare l'ipotesi proposta da Uzunçu. Inoltre, noi ipotizziamo che questo dato potrebbe rappresentare una riserva di TGF- $\beta$ 3 e CTGF, che potrebbe contribuire alla rapida ricrescita dei leiomiomi che si osserva al termine della terapia medica.

I nostri risultati relativi all'immuno-espressione di CTGF nel miometrio e nei leiomiomi dopo trattamento con GnRH-a e tibolone, suggeriscono che il tibolone non influenza la riduzione dell'espressione di CTGF osservata dopo somministrazione di GnRH-a. Il mancato effetto del tibolone sull'espressione dei growth factors coinvolti nel turnover della ECM, se confermato da studi condotti su pazienti trattate soltanto con tibolone, potrebbe dare almeno una parziale spiegazione del fatto che il tibolone non interferisce con la riduzione di volume uterino osservata durante la terapia con GnRH-a.

In conclusione, questo braccio dello studio focalizza gli effetti dei GnRH-a e del tibolone sull'espressione di TGF- $\beta$ 3 e CTGF nei leiomiomi

uterini e nel miometrio e supporta l'ipotesi di un ruolo patogenetico di questi fattori di crescita nella fibromatosi uterina.

Anche se saranno necessari ulteriori studi, i nostri risultati possono contribuire a migliorare la conoscenza dell'esatto meccanismo con cui i fattori di crescita promuovono i leiomiomi uterini nonché allo sviluppo di nuove terapie, come l'inibizione specifica dell'attività dei fattori di crescita, allo scopo di mettere a punto trattamenti medici più specifici per la più frequente patologia ginecologica benigna dell'età fertile.

## *Pubblicazioni*

I risultati del primo braccio dello studio sono oggetto delle seguenti pubblicazioni, di cui si allega copia:

1. De Falco M, Staibano S, D'Armiento FP, Mascolo M, Salvatore G, Busiello A et al. *Preoperative treatment of uterine leiomyomas: clinical findings and expression of transforming growth factor-beta3 and connective tissue growth factor*. J Soc Gynecol Investig 2006;13(4):297-303.
2. De Falco M, Carbone IF, Pollio F, Busiello A, Ciociola F, Di Nardo MA, Pontillo M, Scaramellino M, Schiraldi P, Staibano S, Di Lieto A. *La terapia medica prechirurgica della fibromiomas uterina: aspetti clinici ed immunoespressione di TGF- $\beta$ 3 e CTGF*. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.
3. De Falco M, Staibano S, Pollio F, Pontillo M, Busiello A, Carbone F, Ciociola F, Di Lieto A. *Preoperative treatment of uterine leiomyomas: clinical findings and expression of TGF-beta 3 and*

*CTGF*. 12<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence, March 2-5, 2006. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22 (suppl. 1):136

4. De Falco M, Staibano S, D'Armiento FP, Mascolo M, Salvatore G, Busiello A, Carbone IF, Ciociola F, Di Nardo MA, Votino R, Di Lieto A. *Preoperative treatment of uterine leiomyomas: clinical findings and expression of TGF-beta 3 and CTGF* (Comunicazione). 9<sup>th</sup> International Symposium on GnRH "The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in cancer and reproduction". Berlino, Germania, 10-12 febbraio 2008, pag. 31.

# Preoperative Treatment of Uterine Leiomyomas: Clinical Findings and Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 and Connective Tissue Growth Factor

Marianna De Falco, MD, Stefania Staibano, MD, Francesco Paolo D'Armiento, MD, Massimo Mascolo, MD, Gaetano Salvatore, MD, Anna Busiello, MD, Ilma Floriana Carbone, MD, Fabrizio Pollio, MD, and Andrea Di Lieto, MD, PhD

**OBJECTIVE:** To evaluate the clinical features and the expression of transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) and connective tissue growth factor (CTGF) in myometrium and uterine leiomyomas after preoperative treatment with gonadotropin-releasing hormone-analogs (GnRH-a) and tibolone.

**METHODS:** Twenty-three patients received 3.75 mg leuprolide acetate depot for 4 months. Twenty-two patients received the same therapy plus 2.5 mg tibolone daily. Patients underwent uterine surgery after therapy. Twenty-two untreated patients underwent surgery directly. Hematologic tests, bone mineral density (BMD) measurement, and ultrasonographic evaluation of uterine volume were performed before and after treatment. Menorrhagia and pelvic pain were evaluated with a visual analog scale. Hot flushes were recorded in daily diaries. Immunohistochemical expression of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in myometrium and myoma samples was evaluated semiquantitatively.

**RESULTS:** After therapy, hemoglobin and iron levels similarly increased in both groups. BMD significantly decreased only in the GnRH-a group. Uterine volume similarly decreased in both groups. No patient had menorrhagia or pelvic pain at the end of therapy. The number of hot flushes increased after the first month in the GnRH-a group; in the GnRH-a plus tibolone group, it remained constant and was lower. In untreated cases, TGF- $\beta$ 3 and CTGF smooth muscle cell immunoreactivity was lower in myometrium than in leiomyomas. After medical treatment, growth factor immunoreactivity remained unchanged in myometrial samples and was reduced in leiomyomas. Endothelial cells showed strong immunopositivity, both in untreated and in treated cases.

**CONCLUSION:** This study focuses on the effects of GnRH-a and tibolone on TGF- $\beta$ 3 and CTGF expression in myometrium and myomas and supports the hypothesis of a pathogenetic role of these growth factors in uterine fibromatosis. (*J Soc Gynecol Invest* 2006;13:297-303) Copyright © 2006 by the Society for Gynecologic Investigation.

**KEY WORDS:** Uterine leiomyomas, GnRH-analog, tibolone, TGF- $\beta$ 3, CTGF.

Medical therapy of uterine leiomyomas with gonadotropin-releasing hormone-analogs (GnRH-a), aimed to reduce uterus and leiomyoma size before surgery and to treat menorrhagia, is often a preoperative option in premenopausal women. Leiomyomas usually regain their original size 1 to 3 months after the end of administration. The adverse climacteric side effects associated with GnRH-a therapy prevent its prolonged use.

Tibolone, a synthetic steroid structurally related to norethindrol, is used as an add-back agent to GnRH-a, also in the

short-term preoperative treatment of women suffering from uterine fibromatosis.<sup>1</sup> Tibolone achieves a reduction in vasomotor symptoms and hot flushes, without compromising the bone mass and without influencing the therapeutic effects of GnRH-a.<sup>2</sup>

GnRH-a act on uterine fibroids through a down-regulation of ovarian steroids synthesis. Furthermore, they are believed to achieve their effects on uterine and leiomyoma size also through modifications in the expression of several growth factors, as demonstrated by in vitro studies.<sup>3</sup> The abundance of connective tissue and extracellular matrix (ECM) is a distinctive feature of uterine leiomyomas. ECM is believed to play a dynamic role in leiomyoma growth, by influencing cell proliferation and differentiation, and by serving as a reservoir of biologically active growth factors.<sup>4</sup>

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a dimeric polypeptide of 112 kd existing in three isoforms, has probably been the

From the Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione, and the Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Napoli "Federico II," Napoli, Italia.

Supported by Grant No. 2002061134\_001 from the Italian Ministry of University and Scientific Research.

Address correspondence and reprint requests to: Andrea Di Lieto, MD, PhD, Via Luca Giordano, 120, 80127 Napoli, Italia. E-mail: dilieto@unina.it

Copyright © 2006 by the Society for Gynecologic Investigation.  
Published by Elsevier Inc.

1071-5576/06/\$32.00  
doi:10.1016/j.jgi.2006.02.008

most extensively studied growth factor in leiomyoma within the last few years. It is a key factor in the pathogenesis of several fibrotic diseases, because it induces the synthesis of many of the ECM components leading to fibrosis.<sup>5</sup> In uterine leiomyomas, TGF- $\beta$  seems to have a role in promoting the synthesis of fibronectin and collagen.<sup>5-7</sup> The isoform 3 of TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 3) is the dominant one in cells of mesenchymal origin, including leiomyoma smooth muscle cells.<sup>8</sup> An up-regulation of this isoform by progesterone has been demonstrated in leiomyoma samples.<sup>9</sup> Furthermore, the higher TGF- $\beta$ 3 expression in leiomyoma than in myometrium confirms the hypothesis of a pathogenetic role of this growth factor in uterine leiomyomatosis.<sup>9</sup>

GnRH-a administration induces leiomyoma regression, together with alterations in blood flow, ECM, and cellular contents. TGF- $\beta$  expression in myometrial smooth muscle cells exposed to GnRH-a has been found to be reduced.<sup>5</sup> An increase in ECM degradation<sup>10</sup> and a suppression of TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 3<sup>11</sup> production have been found in uterine leiomyomas after treatment with GnRH-a. This could be due to the fact that expression of TGF- $\beta$  isoforms in uterine fibroids is under the control of sex steroid hormones,<sup>3,11</sup> even if a direct role of GnRH-a has been hypothesized.<sup>3</sup> No evidence exists about the effects of tibolone alone or plus GnRH-a on TGF- $\beta$  expression in myometrium or uterine leiomyomas.

Some molecules seem to mediate the biologic effects of TGF- $\beta$ . Connective tissue growth factor (CTGF) is one of the downstream regulators for TGF- $\beta$  in wound healing.<sup>12</sup> An up-regulation of CTGF by isoform 1 (TGF- $\beta$ 1) has been demonstrated in airway smooth muscle cells.<sup>13</sup> CTGF is a 38-kd member of the "CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH)" family,<sup>14</sup> produced by cultured endothelial cells.<sup>15</sup> It is involved in tissue repair and regeneration, through the stimulation of cell proliferation, chemotaxis, adhesion, and ECM formation.<sup>12,16</sup> High CTGF levels have been demonstrated in several pathologic conditions, such as scleroderma,<sup>17</sup> atherosclerosis,<sup>18</sup> pulmonary fibrosis,<sup>19</sup> renal fibrosis,<sup>20</sup> and benign mesenchymal tissue growths.<sup>21</sup> There is little experimental evidence of CTGF expression in myometrium and uterine leiomyomas. CTGF expression in vascular endothelial cells of myometrium and leiomyomas has been demonstrated.<sup>22</sup> Furthermore, a reduced expression of CTGF gene in uterine leiomyomas relative to myometrium has been described recently.<sup>23</sup> To our knowledge, no study about the effects of GnRH-a therapy alone or plus tibolone on CTGF expression in myometrium or leiomyomas has been reported in the literature.

The aim of the present study was to evaluate the clinical features and the immunoeexpression of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in myometrium and leiomyomas after short-term preoperative treatment with GnRH-a and with GnRH-a plus tibolone, to contribute to the elucidation of the possible pathogenetic role of these profibrotic growth factors in uterine leiomyomatosis.

## MATERIAL AND METHODS

Sixty-seven premenopausal women suffering from symptomatic uterine fibromatosis referred to the Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine of the University "Federico II" of Naples gave their signed informed consent to be enrolled in the study. The study was approved by the Institutional Review Board.

Patients were randomized using a sequential numerical allocation to a randomization list prepared before commencing the study. Twenty-three patients (age  $41.2 \pm 3.5$  [SD]; parity  $2.7 \pm 1.9$  [SD]; body mass index [BMI]  $24.7 \pm 5.6$  [SD]  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (GnRH-a group) were treated with 3.75 mg leuprolide acetate depot in four monthly subcutaneous injections, starting within the first 7 days of the menstrual cycle. Twenty-two patients (age  $39.7 \pm 3.8$  [SD]; parity  $2.8 \pm 1.6$  [SD]; BMI  $25.3 \pm 4.9$  [SD]  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (GnRH-a plus tibolone group) received the same therapy plus 2.5 mg tibolone daily until the day before surgery. Administration of tibolone was begun 15 days after the first vial of analog was given, because hot flushes start about 20 days after the first injection of GnRH-a.<sup>24</sup> All of the patients underwent uterine surgery after a week at most from the end of medical therapy.

Twenty-two patients (age  $40.6 \pm 3.8$  [SD]; parity  $2.5 \pm 1.3$  [SD]; BMI  $24.9 \pm 5.1$  [SD]  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (untreated group) did not receive any therapy and underwent uterine surgery directly, during the follicular phase of the menstrual cycle.

No patient in either group took hormonal therapy, delivered, or underwent uterine surgery within 12 months before the study started, or had a malignant neoplasm.

All patients were submitted to bimanual examination, bone mineral density (BMD) measurement (excluding untreated patients), transabdominal ultrasonography, and routine hematologic tests (including serum hemoglobin level and iron level). The ultrasonographic scans were performed by the same experienced operator by using a Toshiba PowerVision 8000 ultrasonograph (Toshiba Medical Systems, Rome, Italy). Uterine volume was calculated by measuring the three main diameters ( $D_1$ ,  $D_2$ , and  $D_3$ ) and applying the formula of an ellipsoid ( $D_1 \times D_2 \times D_3 \times 0.52$ ). The BMD of the lumbar spine (L2-L4) was determined by anteroposterior scan with the use of dual energy x-ray absorptiometry (Dexa QDR 1000; Hologic, Waltham, MA). Bone mineral content ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) was divided by bone width (cm) to yield an index ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) that was used to standardize the findings for bone size. The absorptiometric findings were examined by the same investigator.

The myoma-related symptoms (menorrhagia and pelvic pain) were evaluated using a visual analog scale ranging from 0 to 10. Patients recorded the number of hot flushes in daily diaries.

All clinical and laboratory tests were repeated after medical therapy. Myomectomy or hysterectomy was then performed.

Immunohistochemical staining was performed on 5- $\mu\text{m}$  thick serial sections of formalin-fixed, paraffin embedded samples from leiomyomas and, when available, from adjacent myometrium. Sampling of normal myometrium was per-

**Table 1.** Uterine Volume, Hematologic Parameters, Menorrhagia, and Pelvic Pain at Admission and After Therapy (data calculated as means  $\pm$  SD)

Characteristics	Untreated group	GnRH-a group			GnRH-a + tibolone group		
		At admission	After therapy	<i>P</i>	At admission	After therapy	<i>P</i>
Uterine volume (cm <sup>3</sup> )	803.2 $\pm$ 198.2	828.9 $\pm$ 172.5	469.1 $\pm$ 127.9	<.05	799.3 $\pm$ 180.1	443.1 $\pm$ 131.5	<.05
BMD (g/cm <sup>3</sup> )	—	1.042 $\pm$ 0.039	1.008 $\pm$ 0.048	<.05	1.038 $\pm$ 0.035	1.033 $\pm$ 0.029	NS
Hemoglobin level (g/dL)	9.1 $\pm$ 1.8	9.8 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 1.8	<.05	9.3 $\pm$ 1.9	12.1 $\pm$ 1.6	<.05
Serum iron level ( $\mu$ g/dL)	42.8 $\pm$ 7.1	39.7 $\pm$ 7.4	78.5 $\pm$ 5.2	<.05	41.7 $\pm$ 6.9	80.1 $\pm$ 4.7	<.05
Menorrhagia*	8.1 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 1.1	—	—	7.3 $\pm$ 1.4	—	—
Pelvic pain*	4.7 $\pm$ 1.5	4.9 $\pm$ 1.3	—	—	5.1 $\pm$ 1.1	—	—

NS = not significant.

\* Calculated using a visual analog scale ranging from 0 to 10.

formed by selecting myometrial tissue distant from myomas at least 0.5 cm (in most of the patients the distance was 1.0 cm); this procedure ensures the cut-off of the pseudocapsule from each sample.

Pretreatment of sections with a heat-induced, antigen-retrieval technique, with incubation in a 650-W microwave oven (three sequential steps of 4 minutes each in a citrate buffer [pH 6.0] 10 mM) was performed. Sections were incubated for 20 minutes at room temperature with 0.3% hydrogen peroxide in methanol to quench the endogenous peroxidases, and with non-immune horse serum (1:20; Dakopatts, Hamburg, Germany) diluted in phosphate-buffered saline (PBS)-bovine serum albumin (1%) for 25 minutes, to prevent nonspecific immunostaining. After three washings with Tris-saline buffer, sections were incubated overnight at 4C, in a moist chamber, with primary antibodies: anti-TGF- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3, polyclonal antibody, sc-82, rabbit polyclonal, epitope mapping at the C-terminus, 1:250 dilution; Santa Cruz Biochemistry, Santa Cruz, CA) and anti-CTGF (CTGF, polyclonal antibody, sc-14939, epitope mapping within an internal region, 1:250 dilution; Santa Cruz Biochemistry).

Immunodetection was performed with sequential 20-minute incubations with biotinylated link-antibodies and peroxidase-labeled streptavidin (LSAB-HRP; DAKO, Carpinteria, CA), 3,3-diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA) with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a substrate chromogen solution. After nuclear counterstaining with hematoxylin, sections were mounted with a synthetic medium (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany). Positive controls for the expression of both antibodies tested were performed on normal uterine tissue for TGF- $\beta$ 3 and on connective tissue of the early phase of wound-healing process for CTGF. Negative controls were performed on the same tissues using nonspecific non-immune serum instead of primary antibodies.

The immunohistochemical staining was evaluated separately by two observers, unaware of the clinical data of the patients. At least 10 high-power fields were randomly selected among representative areas of the leiomyomas, five from the periphery and five from the central area, and of the myometrium samples. Only cells with a definite brown cytoplasmic staining were judged as positive for each of the antibodies used. The immunohistochemical expression was quantified using a semiquan-

tative method: the number of positively stained smooth muscle cells was determined for each patient and expressed as percentage of positive cells among the total cells of the 10 fields. Then, the patients were assigned to one of the following arbitrary categories: + ( $\leq$ 30% positive cells), ++ (>30–50%), +++ (>50–70%), ++++ (>70%).

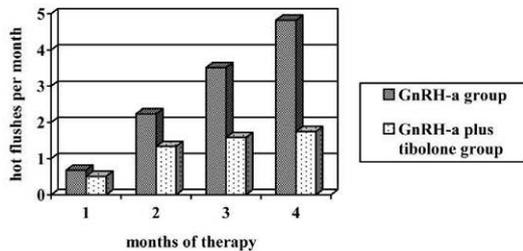
In all the cases, immunostaining was graded without previous knowledge of the clinical data of the patients.

The statistical analysis was performed using the Student *t* test to compare parametric variables and the Mann-Whitney *U* test to compare nonparametric variables. Levels of statistical significance were set at *P* values <.05. The *k* coefficient was used to assess the level of intraobserver and interobservers agreement.

## RESULTS

All patients completed the study. Serum hemoglobin level and iron level significantly increased after therapy, without any significant difference between the two treated groups (Table 1). BMD significantly decreased after therapy in the GnRH-a group, in comparison with baseline values. In the GnRH-a plus tibolone group, we did not observe any statistically significant decrease after therapy in comparison with baseline values (Table 1). Mean uterine volume significantly reduced after therapy, without any significant difference between the two treated groups (Table 1). We found a 56.6% decrease in the GnRH-a group and a 55.4% decrease in the GnRH-a plus tibolone group. Two patients in the GnRH-a treated group and one patient in the GnRH-a plus tibolone group showed a less than 10% decrease of uterine volume. These patients were defined as "nonresponders." Myoma-related symptoms, expressed as means of the scores of the visual analog scale for each symptom  $\pm$  SD, were similar in the two groups at the beginning of the study. No patient had menorrhagia or pelvic pain at the end of therapy (Table 1). The number of hot flushes increased after the first month in the GnRH-a group. In the GnRH-a plus tibolone group, the mean number of hot flushes remained relatively constant from the second month and was significantly lower than in the GnRH-a group (Figure 1).

Among untreated patients, eight underwent total abdominal hysterectomy, one total laparoscopic hysterectomy, ten abdominal myomectomy, and three laparoscopic myomectomy. Among GnRH-a treated patients, three underwent total ab-



**Figure 1.** Mean number of hot flushes per month in patients treated with GnRH-a and in patients treated with GnRH-a plus tibolone.

dominal hysterectomy, three total laparoscopic hysterectomy, ten abdominal myomectomy, and seven laparoscopic myomectomy. Among the GnRH-a plus tibolone treated patients, three underwent total abdominal hysterectomy, one total laparoscopic hysterectomy, 12 abdominal myomectomy, and six laparoscopic myomectomy.

Samples of myometrium were obtained by patients submitted to hysterectomy: nine untreated patients, six GnRH-a treated patients, and four GnRH-a plus tibolone treated patients.

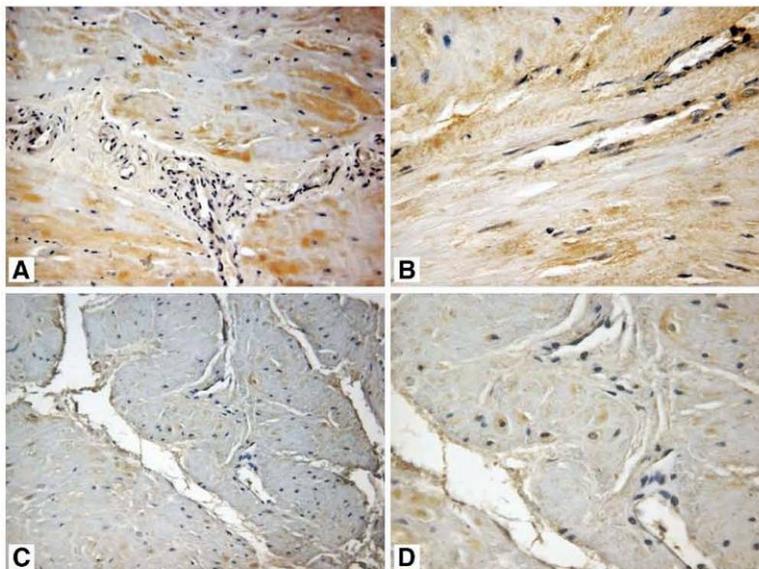
Leiomyomas obtained after uterine surgery were composed of interlacing bundles of smooth muscle cells and a variable content of fibroblasts and blood vessels, with scattered areas of hyalinization, defined as acellular collagen with few or no nuclei.

In untreated lesions, the immunohistochemical analysis showed positive staining for TGF- $\beta$ 3 (Figure 2A and B) and CTGF (Figure 3A and B) both in leiomyoma smooth muscle cells and in endothelial cells, as well as in normal myometrium.

Leiomyoma smooth muscle cells showed strong immunopositivity for the two growth factors studied, with values comprised in categories +++ and ++++ of the semiquantitative score (Table 2). No difference was found respective to the topography of the samples (peripheral or center), but CTGF-positive smooth muscle cells were almost always localized in perivascular areas, while the immunopositivity for TGF- $\beta$ 3 was more diffuse, far from blood vessels too. In normal myometrium, almost uniform immunostaining for both antibodies (involving up to 50% of muscle cells) was observed, without particular topographic restriction (ie, any reinforcement of the signal in perivascular areas) and always with a low intensity of the signal. Immunopositivity for both of the antibodies was found in vascular endothelial cells.

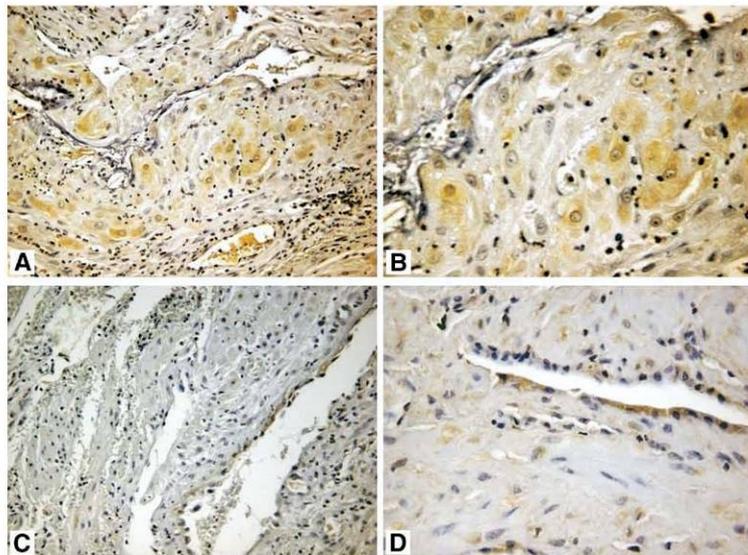
Smooth muscle cells of treated leiomyomas showed significantly lower immunopositivity ( $P < .05$ ) both for TGF- $\beta$ 3 (Figure 2C and D) and CTGF (Figure 3C and D), if compared with untreated lesions, with values corresponding to categories + and ++ of the semiquantitative score (Table 2). No difference was found among GnRH-a treated and GnRH-a plus tibolone treated lesions (Table 2). We found a reduction both in the number of stained cells and the intensity of staining. No difference was found in the center compared with the periphery of leiomyomas. The immunopositivity of myometrial smooth muscle cells and of vascular endothelial cells for both of the antibodies was similar to that observed in untreated patients.

The immunohistochemical findings in samples from non-responders were similar to those observed in untreated patients. Both leiomyoma and myometrium smooth muscle cells showed strong immunopositivity, with a semiquantitative score of +++, both for TGF- $\beta$ 3 and for CTGF expres-



**Figure 2.** A) A case of untreated leiomyoma, showing a definite immunopositivity for anti-TGF- $\beta$ 3 in >25% of muscle cells (LSAB,  $\times 106$ ). B) The same case, at higher magnification (LSAB,  $\times 250$ ). C) A case of treated leiomyoma, showing only focal, low immunopositivity for anti-TGF- $\beta$ 3 in muscle cells (LSAB,  $\times 106$ ). D) The same case, at higher magnification (LSAB,  $\times 250$ ).

**Figure 3.** A) A case of untreated leiomyoma, showing a definite immunopositivity for anti-CTGF in >25% of muscle cells (LSAB,  $\times 106$ ). B) The same case, at higher magnification (LSAB,  $\times 250$ ). C) A case of treated leiomyoma, showing only a focal, low immunopositivity for anti-CTGF in muscle cells (LSAB,  $\times 106$ ). D) The same case, at higher magnification (LSAB,  $\times 250$ ).



sion. Vascular endothelial cells were positive for both of the antibodies.

The  $k$  coefficient for the evaluation of all the antibodies tested in the study was 0.9 for the intraobserver agreement (excellent agreement) and 0.85 for the interobserver agreement (excellent agreement).

### DISCUSSION

Data reported in the present study confirm the effectiveness of GnRH-a preoperative therapy to control myoma-related symptoms and anemia and to cause a significant reduction in uterine size. The addition of tibolone to GnRH-a did not modify the therapeutic effects of the analogs on hematologic parameters and uterine volume, but it was associated with a significant reduction in menopausal-like symptoms and with unchanged BMD, according to other literature data.<sup>24</sup>

GnRH-a action on uterine leiomyomas is believed to occur both through a down-regulatory effect on ovarian steroids synthesis and through changes in cell growth, apoptosis, and expression of several growth factors in myometrial and leiomyoma cells.<sup>3</sup> These changes are mediated by the hypoestrogenic state induced by GnRH-a treatment, but low-affinity/high-

capacity GnRH receptors have been described in myometrium and leiomyomas<sup>25</sup> and a direct role of GnRH-a has also been hypothesized in several studies.<sup>3,11</sup> Nevertheless, the doses of GnRH-a required to achieve some actions (ie, antiproliferative effect) in vitro exceed the serum levels required to suppress ovarian activity, probably due to the low affinity and the high capacity of the GnRH binding sites.<sup>26</sup> Moreover, the action of GnRH-a with respect to intracellular signaling is still unclear.

TGF- $\beta$  plays a key role in the regulation of cellular migration, growth, and differentiation and in the turnover of ECM in several lesions characterized by abundant fibrous connective tissue elements. TGF- $\beta$ 3 is the dominant isoform in smooth muscle cells.<sup>8</sup> Compared with surrounding unaffected myometrium, leiomyomas overexpress TGF- $\beta$ 3.<sup>27</sup> Decreased TGF- $\beta$  expression in both myometrium and leiomyoma smooth muscle cells has been described in vitro as an effect of GnRH-a.<sup>3</sup> GnRH-a induced leiomyoma regression is associated, in vivo, with down-regulation of the expression of TGF- $\beta$  and its receptors.<sup>11</sup> The present study confirms, in untreated patients, a higher TGF- $\beta$ 3 expression in leiomyoma than in unaffected myometrium. After treatment with GnRH-a or with GnRH-a plus tibolone, instead, together with decreased uterine volume

**Table 2.** Range of Semiquantitative Scores for the Immunopositivity of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in Myometrium and Leiomyoma Smooth Muscle Cells From Untreated, GnRH-a Treated, and GnRH-a Plus Tibolone Treated Patients

Growth factors	Untreated group			GnRH-a group			GnRH-a plus tibolone group		
	Myometrium	Center of myoma	Periphery of myoma	Myometrium	Center of myoma	Periphery of myoma	Myometrium	Center of myoma	Periphery of myoma
TGF- $\beta$ 3	+/+++	+++	+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++
CTGF	+/+++	+++ /+++++	+++ /+++++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++	+/+++

we found TGF- $\beta$ 3 expression unaltered in myometrium and lower in leiomyomas in comparison with untreated cases. These observations could confirm a role of TGF- $\beta$ 3 in leiomyoma progression. In uterine leiomyomas, TGF- $\beta$ 3 up-regulation by progesterone results in decreased activity of matrix metalloproteinases (MMPs), the key enzymes in ECM degradation, with a subsequent increase in ECM production.<sup>9</sup> Therapy with GnRH-a seems to cause a significant decrease in tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and an increase in MMP mRNA in leiomyomas compared with untreated tumors.<sup>10</sup> So, a GnRH-a induced down-regulation of TGF- $\beta$ 3 synthesis, with a subsequent decrease in ECM production and reduced smooth muscle cells proliferation, could be among the mechanisms of uterine volume shrinkage after GnRH-a therapy. Reduced tissue and receptor response to GnRH-a could affect this down-regulation, giving a possible explanation for the scarce decrease in uterine volume observed in the nonresponders.

For the first time in the literature, we present data about the effect of the add-back therapy with tibolone on TGF- $\beta$ 3 expression in myometrium and leiomyomas: we did not observe any significant difference in comparison with samples from GnRH-a treated patients. This could be another evidence of the safety of tibolone as an add-back agent to GnRH-a, even if our data should be confirmed by studies performed on leiomyomas treated with tibolone alone.

CTGF, up-regulated by TGF- $\beta$  and acting on endothelial cells, fibroblasts, and smooth muscle cells, elicits stimulation of mitosis, cell proliferation, and ECM production.<sup>15,16,28</sup> Uzumcu et al<sup>22</sup> found CTGF immunoreactivity only in the endothelial cells of human uterine leiomyomas. Reduced expression of CTGF gene in leiomyomas relative to myometrium has also been described.<sup>23</sup> In contrast with the aforementioned reports, we found strong CTGF immunopositivity both in vascular endothelial cells and in myometrium and leiomyoma smooth muscle cells. Furthermore, in untreated patients CTGF expression in smooth muscle cells was lower in myometrium than in leiomyomas. As regards treated patients, for the first time we studied the effects of preoperative medical therapy on CTGF immunohistochemical expression in myometrium and leiomyomas. Myometrial immunopositivity was found unchanged, while leiomyomas showed a significantly reduced number of positive smooth muscle cells, with weak immunostaining. This pattern, overall similar to that observed for TGF- $\beta$ 3 expression, could be due, at least in part, to a regulation of CTGF activity by TGF- $\beta$ 3, like that observed in other types of tissues.<sup>15</sup> CTGF might play a role in uterine leiomyoma growth, probably by regulating cell proliferation and ECM production. Uzumcu et al,<sup>22</sup> based on the CTGF immunoreactivity of leiomyoma vascular endothelial cells, hypothesized that CTGF could act through an angiogenic pathway to stimulate leiomyoma growth and development. In the present report, we found strong TGF- $\beta$ 3 and CTGF immunopositivity in vascular endothelial cells, both in treated and untreated leiomyomas. This pattern, already observed for other growth factors,<sup>29</sup> could confirm the hypothesis

proposed by Uzumcu and colleagues. Moreover, we hypothesize that this feature could represent a reservoir of TGF- $\beta$ 3 and CTGF, which could contribute to the rapid regrowth of leiomyoma usually observed at the end of the medical treatment.

Our results about CTGF immunoreexpression in myometrium and leiomyomas after treatment with GnRH-a plus tibolone suggest that tibolone does not influence the decrease in CTGF expression observed after GnRH-a administration. The hypothesized lack of influence of tibolone on the expression of growth factors involved in ECM turnover, if confirmed by studies performed on patients treated with tibolone alone, could give a partial explanation for the fact that tibolone does not interfere with the uterine volume shrinkage during GnRH-a therapy.

In conclusion, the present report focuses on the effects of GnRH-a and tibolone on the expression of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in uterine leiomyomas and myometrium and supports the hypothesis of a pathogenetic role of these growth factors in uterine fibromatosis. Even if further studies are needed, our results could contribute an improvement to the knowledge of the exact mechanism by which growth factors promote uterine leiomyomas and to the development of new kinds of therapies, such as specific inhibition of growth factor activity, in order to achieve more specific medical treatments of this widespread disease.

## REFERENCES

1. Palomba S, Pellicano M, Affinito P, Di Carlo C, Zullo F, Nappi C. Effectiveness of short-term administration of tibolone plus gonadotropin-releasing hormone analogue on the surgical outcome of laparoscopic myomectomy. *Fertil Steril* 2001;75:429–33.
2. Palomba S, Affinito P, Di Carlo C, Bifulco G, Nappi C. Long term administration of tibolone plus gonadotropin-releasing hormone agonist for treatment of uterine leiomyomas: Effectiveness and effects on vasomotor symptoms, bone mass, and lipid profile. *Fertil Steril* 1999;72:889–95.
3. Chegini N, Ma C, Tang XM, Williams RS. Effects of GnRH analogues, "add-back" steroid therapy, antiestrogen and anti-progestins on leiomyoma and myometrial smooth muscle cell growth and transforming growth factor-beta expression. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1071–8.
4. Hulbooy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:27–45.
5. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-B stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986;261:4337–45.
6. Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, et al. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7362–6.
7. Ma C, Chegini N. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF- $\beta$ 1. *Mol Hum Reprod* 1999;5:950–4.
8. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, et al. A new type of transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 3. *EMBO J* 1988;7:3737–43.
9. Arici A, Sozen I. Transforming growth factor- $\beta$ 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000;73:1006–11.

10. Dou Q, Tamuzzer RW, Williams RS, Schultz GS, Chegini N. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in leiomyomata: A mechanism for gonadotropin releasing hormone agonist-induced tumor regression. *Mol Hum Reprod* 1997;3:1005-14.
11. Dou Q, Zhao Y, Tamuzzer RW, et al. Suppression of transforming growth factor-beta (TGF beta) and TGF beta receptor messenger ribonucleic acid and protein expression in leiomyomata in women receiving gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3222-30.
12. Pawar S, Kartha S, Toback FG. Differential gene expression in migrating renal epithelial cells after wounding. *J Cell Physiol* 1995;165:556-65.
13. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L68-76.
14. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Rev* 1999;20:189-206.
15. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: A cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991;114:1285-94.
16. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993;4:637-45.
17. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996;106:729-33.
18. Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Fujii T, Luscher TF. Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1999;100:2108-12.
19. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin like growth factor binding protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidiasis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:693-700.
20. Ito Y, Aten J, Bende RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998;53:853-61.
21. Igarashi A, Hayashi N, Nashiro K, Takehara K. Differential expression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1998;25:143-8.
22. Uzumcu M, Al Homsy MF, Ball DK, et al. Localization of connective tissue growth factor in human uterine tissues. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1093-8.
23. Weston G, Trajstman AC, Gargett CE, Manuelpillai U, Vollenhoven BJ, Rogers PAW. Fibroids display and anti-angiogenic pattern gene expression profile when compared with adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9:541-9.
24. Palomba S, Affinito P, Tommaselli GA, Nappi C. A clinical trial on the effects of tibolone association with gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998;70:111-8.
25. Wiznitzer A, Marbach M, Hazum E, Insler V, Sharoni Y, Levy J. Gonadotropin releasing hormone specific binding sites in uterine leiomyomata. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1326-31.
26. Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S, Williams RS. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3215-21.
27. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF- $\beta$ . *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:913-20.
28. Frazier KS, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996;107:404-11.
29. Di Lieto A, De Falco M, Staibano S, et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on uterine volume and vasculature and on the immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:353-8.

**LA TERAPIA MEDICA PRECHIRURGICA DELLA FIBROMIOMATOSI UTERINA:  
ASPETTI CLINICI ED IMMUNOESPRESSIONE DI TGF-beta3 E CTGF**

*Marianna De Falco<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli “Federico II” – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione, <sup>2</sup> Università degli Studi di Napoli “Federico II” – Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali

**Scopo:** Valutazione, in 67 pazienti affette da fibromiomas uterina sintomatica, delle caratteristiche cliniche (menorragia, dolore pelvico, vampate) e dell’immuno-espressione del TGF-beta3 e del CTGF nel miometrio e nei miomi dopo trattamento prechirurgico con GnRH-a e tibolone.

**Materiali e metodi:** 23 pazienti hanno ricevuto 3.75 mg di leuprolide acetato depot per 4 mesi. 22 pazienti hanno ricevuto la stessa terapia più 2.5 mg di tibolone/die. Dopo la terapia, le pazienti sono state sottoposte ad intervento chirurgico di isterectomia o miomectomia. 22 pazienti non trattate hanno subito l’intervento direttamente. Tutte sono state sottoposte ad esami ematochimici di routine, misurazione della densità minerale ossea (DMO) e valutazione ecografica del volume uterino, prima e dopo il trattamento. L’espressione immunoistochimica di TGF- beta3 e CTGF è stata valutata su campioni di miometrio e miomi ottenuti durante l’intervento chirurgico.

**Risultati:** Dopo la terapia, i parametri ematochimici sono migliorati e il volume dell’utero si è ridotto in entrambi in gruppi, in maniera simile. La DMO è diminuita solo nel gruppo trattato con GnRH-a. Il numero delle vampate è aumentato dopo il primo mese solo nel gruppo GnRH-a. Nessuna paziente presentava menorragia o dolore pelvico al termine della terapia medica. Nei casi non trattati, l’immuno-espressione di TGF-beta3 e CTGF nelle fibrocellule muscolari lisce era minore nel miometrio rispetto ai miomi; nelle donne trattate, invece, essa è rimasta invariata nel miometrio e si è ridotta nei leiomiomi. Le cellule endoteliali mostravano un’intensa immunopositività, sia nei casi trattati che non trattati.

**Conclusioni:** Lo studio conferma l’efficacia della terapia preoperatoria a breve termine con GnRH-a nelle donne in età premenopausale affette da fibromiomas uterina e sottolinea che la somministrazione di tibolone non ne influenza gli effetti sull’accrescimento uterino. Per la prima volta in letteratura, sono analizzati gli effetti dei GnRH-a e del tibolone sull’espressione di TGF-beta3 e CTGF nel miometrio e nei leiomiomi uterini, supportando l’ipotesi di un ruolo patogenetico di questi fattori di crescita nella fibromiomas uterina. Questi risultati potrebbero incrementare le conoscenze sull’esatto meccanismo alla base dello sviluppo dei miomi uterini e potrebbero aprire la strada a nuove terapie “mirate” ad una specifica inibizione di tali fattori di crescita.

levels. A combination of inositol, folic acid and clomiphene citrate significantly increases the ovulation and conception rates in these patients.

## OP55

### THE ROLE OF METFORMIN IN TREATMENT OF INFERTILITY IN PCOS

Z. Salam, M. Mehboob, V. Dixit, K. Khan, W. W. Khine, E. Cheng, B. Dawlatly

*Whipps Cross University Hospital NHS Trust, London, United Kingdom*

**Background:** Polycystic ovarian syndrome is a leading cause of infertility, mainly due to anovulation. Although clomiphene citrate has been used for the induction of ovulation, however, recent evidence suggests that insulin sensitizing agents such as metformin may also be effective. In our study we assessed the effect of metformin on the fertility of patients with polycystic ovarian syndrome.

**Method:** This was a retrospective cohort study which included all women who successfully achieved a pregnancy of >26 weeks gestation over a period of two years between January 2002 and December 2004. Women who had polycystic ovarian syndrome but infertility was not their concern were excluded from the study. During that period 71 patients with polycystic ovarian syndrome were treated for either primary or secondary infertility. Thirty-seven patients (52.1%) received metformin alone. Twenty-one patients (29.5%) received clomiphene citrate and metformin while seven patients (9.8%) received progestogen. Six patients (8.4%) were given tamoxifen. There was one case of pulmonary embolism in the clomiphene citrate group. She had a BMI of 46 and was successfully treated.

**Results:** 17 patients (43%) conceived on metformin alone. Seven patients (33%) got pregnant while on clomiphene citrate and metformin combined. One patient each from tamoxifen and progestogen treatment groups, 14% and 16% consecutively, was successful in conceiving.

**Conclusion:** Ovulation induction agents have been associated with increased risk of ovarian cancer. Metformin appears to be a safe and efficient first line treatment for ovulation induction. Other ovulation induction agents (clomiphene citrate and tamoxifen) should be reserved for cases ovulation induction fails with metformin.

## OP56

### PREOPERATIVE TREATMENT OF UTERINE LEIOMYOMAS: CLINICAL FINDINGS AND EXPRESSION OF TGF- $\beta$ 3 AND CTGF

M. De Falco<sup>1</sup>, S. Staibano<sup>2</sup>, F. Pollio<sup>1</sup>, M. Pontillo<sup>1</sup>, A. Busiello<sup>1</sup>, F. Carbone<sup>1</sup>, F. Ciociola<sup>1</sup>, A. Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione – Università degli Studi di Napoli “Federico II”; Italy; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali - Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Italy

TGF- $\beta$ 3 and CTGF are probably involved in uterine leiomyoma pathogenesis through promoting extracellular matrix formation. GnRH-analogue (GnRH-a) administration induces leiomyoma regression also through a decrease in TGF- $\beta$ 3 synthesis; no data exist about the effect on CTGF expression. Tibolone is a synthetic steroid used as an add back agent to GnRH-a also in the preoperative treatment of uterine fibromatosis. No study is reported on the effect of tibolone on TGF- $\beta$ 3 and CTGF expression in uterine leiomyomas and myometrium. Aim of this study was to evaluate immunoeexpression of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in myometrium and uterine leiomyomas after short-term preoperative treatment with GnRH-a and tibolone.

23 patients received 3.75 mg leuprolide acetate depot for 4 months. 22 patients received the same therapy plus 2.5 mg tibolone daily. Patients underwent uterine surgery after therapy. 22 untreated patients underwent surgery directly. Ultrasonographic evaluation of uterine volume was performed before and after treatment. Immunohistochemical expression of TGF- $\beta$ 3 and CTGF in myometrium and myoma samples was evaluated semiquantitatively. After therapy, uterine volume similarly decreased in both groups. In untreated cases, TGF- $\beta$ 3 and CTGF smooth muscle cell immunoeexpression was lower in myometrium than in leiomyomas. After medical treatment, immunoeexpression remained unchanged in myometrial samples and reduced in leiomyomas. Endothelial cells showed strong immunopositivity, both in untreated and in treated cases. This study focuses on

the effects of GnRH-a and tibolone on TGF- $\beta$ 3 and CTGF expression in myometrium and myomas and could contribute to a better knowledge of the pathogenetic role of these growth factors in uterine fibromatosis.

## OP57

### THE ROLE OF OOCYTE IN THE GENETIC DETERMINATIONS OF FERTILITY AND INFERTILITY

B. Meczekalski

*Department of Gynecological Endocrinology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland*

Our understanding about basis of oocyte growth and development in mammals is not clear yet when compared to that of lower species. This limitations result mainly from the difficulties in the access and manipulation to mammalian, mainly human oocyte. The past decade of research has contributed in a very essential manner to widening our knowledge about the molecular basis of oogenesis. This progress would be impossible without the use of modern techniques molecular biology, equipped with such tools as transgenesis, knock out experiments conducted in mouse.

At present intensive efforts are being made to identify novel oocyte-specific genes and to characterize their roles. Oocyte specific genes may play a very important role in such critical reproductive processes as folliculogenesis, ovulation, fertilization and early embryogenesis.

Several oocyte-specific genes have been identified so far. The most important of them include following genes: zona pellucida 1 (*zp1*), zona pellucida 2 (*zp2*), zona pellucida 3 (*zp3*), growth differentiation factor 9 (*gdf9*), Maternal antigen that embryo require (*Mater*), Factor in the germline, alpha (*fig  $\alpha$* ), histone 1 oocyte specific genes (*H100*), Moloney sarcoma oncogene (*c-mos*), zygotic arrest (*zar1*). All of the above- mentioned oocyte-specific genes identified in mouse have human homologs. *Zp2* and also *Zp3* deficient mice are sterile. These genes play a critical role also in the human fertilization process. There is evidence, that dysregulation of the oocyte *GDF-9* expression may cause folliculogenesis disorders in PCOS patients. *Fig  $\alpha$*  gene and its human homolog are responsible for primordial follicle formation. The role of mutations in *Mater* gene in the ethiopathogenesis of premature ovarian failure is considered.

Using RT-PCR method it was revealed, that expression of *H100* is specific for the oocyte. Hybridization *in situ* confirmed *H100* occurrence in the oocyte at the level of primary, secondary and tertiary follicle. The presence of *H100* in the oocyte at the level of primordial follicle was revealed at a very low level. *H100* may play an important role during the transition of primordial to primary follicle.

It is estimated that idiopathic infertility is account for 17–20%. Probably genetic determinations (ovarian and oocyte) constitute the main factor responsible for idiopathic infertility.

The important achievements from recent and ongoing molecular studies on the oocytic genes create new perspectives with respect to our understanding of fertility mechanism and above all diagnosis and treatment of oocyte-related infertility.

## OP58

### ANALYSIS OF HUMAN TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE (hTERT) MRNA EXPRESSIONS IN THE ENDOMETRIM OF ENDOMETRIOSIS

C. M. Kim, S. H. Cho, S. H. Lee, D. J. Chung, D. W. Lee, K. H. Park, D. J. Cho, B. S. Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Introduction:** Endometriosis is considered a frequent, benign disease with the ability of neoplastic process. The aim of this study is to evaluate limitless replicative potential of eutopic endometrium with endometriosis using the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA.

**Materials and Methods:** Endometrial tissues of 30 endometriosis patients (EMS group) and 30 samples of normal endometrium without endometriosis (control group) were obtained. Each group was subdivided to secretory phase and proliferative phase of menstrual cycle. The expression of hTERT in endometrium was determined by real-time RT-PCR assay based on Taq-Man fluorescence methodology. Variables were analyzed by Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test and Spearman's rank test.



9<sup>th</sup> International Symposium on

# GnRH

The hypothalamic-pituitary-gonadal axis  
in cancer and reproduction

February 10 - 12, 2008, Berlin, Germany



**Under the auspices of:**

The International Society of Gynaecological Endocrinology  
The International Society for the Study of the Aging Male

**PROGRAM AND ABSTRACTS**

[www.kenes.com/gnrh](http://www.kenes.com/gnrh)

**PREOPERATIVE TREATMENT OF UTERINE LEIOMYOMAS: CLINICAL FINDINGS AND EXPRESSION OF TGF-BETA 3 AND CTGF**

**M. De Falco**<sup>1</sup>, S. Staibano<sup>2</sup>, F.P. D'Armiento<sup>2</sup>, M. Mascolo<sup>2</sup>, G. Salvatore<sup>2</sup>, A. Busiello<sup>1</sup>, I.F. Carbone<sup>1</sup>, F. Ciociola<sup>1</sup>, M.A. Di Nardo<sup>1</sup>, R. Votino<sup>1</sup>, A. Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina Della Riproduzione, Università Degli Studi di Napoli "Federico II"*, <sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università Degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy*

**Aims:** To evaluate clinical features and expression of TGF-β3 and CTGF in myometrium and uterine leiomyomas after preoperative treatment with GnRH-a and tibolone.

**Methods:** 23 patients received 3.75 mg leuprolide acetate depot for 4 months. 22 patients received the same therapy plus 2.5 mg tibolone daily. Patients underwent uterine surgery after therapy. 22 untreated patients underwent surgery directly. Hematological tests, bone mineral density (BMD) measurement, and ultrasonographic evaluation of uterine volume were performed before and after treatment. Menorrhagia and pelvic pain were evaluated with a visual analog scale. Hot flushes were recorded in daily diaries. Immunohistochemical expression of TGF-β3 and CTGF in myometrium and myoma samples was evaluated semiquantitatively.

**Results:** After therapy, hemoglobin and iron levels similarly increased in both groups. BMD significantly decreased only in GnRH-a group. Uterine volume similarly decreased in both groups. No patient had menorrhagia or pelvic pain at the end of therapy. The number of hot flushes increased after the first month in GnRH-a group; in GnRH-a plus tibolone group it remained constant and was lower.

In untreated cases, TGF-β3 and CTGF smooth muscle cell immunoexpression was lower in myometrium than in leiomyomas. After medical treatment, growth factor immunoexpression remained unchanged in myometrial samples and reduced in leiomyomas. Endothelial cells showed strong immunopositivity, both in untreated and in treated cases.

**Conclusions:** This study focuses on the effects of GnRH-a and tibolone on TGF-β3 and CTGF expression in myometrium and myomas and supports the hypothesis of a pathogenetic role of these factors in uterine fibromatosis.

**La pseudocapsula dei leiomiomi uterini dopo  
terapia prechirurgica con agonisti del GnRH:  
relazione tra aspetti clinici e modifiche  
immunoistochimiche.**

In pazienti accuratamente selezionate, con fibromatosi uterina sintomatica, la somministrazione pre-operatoria dei GnRH-a è utile per ottenere il compenso dell'anemia sideropenica dovuta alla meno-metrorragia, per ridurre la perdita ematica intraoperatoria e la durata dell'intervento chirurgico e per consentire una chirurgia più conservativa e meno invasiva (3).

Un problema frequentemente riscontrato nella pratica clinica, ma su cui si è poco ricercato, è la difficoltà nell'individuare il corretto piano di clivaggio e, quindi, nell'enucleare i leiomiomi, in pazienti pre-trattate con GnRH-a.

Tradizionalmente, i leiomiomi uterini sono definiti come neoformazioni benigne ben capsulate. In realtà, essi sono circondati soltanto da una pseudocapsula, derivante dalla particolare distribuzione che i fasci di fibrocellule muscolari lisce della porzione periferica del leiomioma e del

miometrio immediatamente circostante assumono per effetto della pressione esercitata dal nucleo più interno (112).

Durante lo sviluppo dei leiomiomi, inoltre, l'intensa angiogenesi alla periferia della lesione determina la formazione di una "capsula vascolare", che garantisce l'apporto ematico necessario alla crescita del mioma (113).

La pseudocapsula rappresenta il piano di clivaggio tra mioma e miometrio che deve essere individuato per l'enucleazione della lesione in corso di intervento chirurgico.

Gli effetti clinici, chirurgici ed istochimici della terapia pre-operatoria con GnRH-a sono documentati in letteratura (3,40,42,44,45,46,74,114,115), ma non sono pubblicati studi sulla possibile relazione tra i suddetti effetti e specifiche modifiche della pseudocapsula dei leiomiomi.

Il primo obiettivo di questo braccio dello studio è valutare gli effetti della terapia pre-chirurgica a breve termine della fibromatosi uterina con GnRH-a sulla durata e sul grado di difficoltà dell'intervento chirurgico e sulla perdita ematica intraoperatoria.

In secondo luogo, sarà effettuata una valutazione istologica della pseudocapsula, confrontando lesioni trattate e non trattate con GnRH-a, allo

scopo di individuare un corrispettivo microscopico delle ripercussioni chirurgiche della terapia.

Infine, si valuteranno gli effetti del trattamento pre-chirurgico con GnRH-a sulla proliferazione cellulare e sulla vascolarizzazione della pseudocapsula dei leiomiomi, speculando sulla possibile influenza esercitata da tali modifiche sul piano di clivaggio, la durata dell'intervento chirurgico e la perdita ematica intraoperatoria.

### *Materiali e metodi*

Lo studio è stato effettuato presso il Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", su 33 pazienti in età premenopausale con singolo mioma uterino intramurale sintomatico.

Le pazienti (età  $37.3 \pm 3.3$  [SD]; parità  $2.3 \pm 1.1$  [SD]; BMI  $24.1 \pm 4.9$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>; diametro medio del mioma  $7.64 \pm 0.7$  [SD] cm) (gruppo GnRH-a) sono state trattate con un'iniezione sottocutanea mensile di triptorelina depot 3.75 mg, iniziando entro i primi 7 giorni del ciclo mestruale. Entro tre settimane dal termine della terapia, le pazienti sono state sottoposte a miomectomia.

29 donne in età premenopausale (gruppo non trattato) (età  $37.5 \pm 3.1$  [SD]; parità  $2.4 \pm 1.1$  [SD]; BMI  $25.4 \pm 4.8$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>; diametro medio del mioma  $7.58 \pm 0.8$  [SD] cm) non hanno assunto GnRH-a e sono state direttamente sottoposte ad intervento chirurgico durante la fase follicolare del ciclo mestruale.

Tutte le pazienti hanno sottoscritto un consenso informato al momento dell'arruolamento nello studio.

Nessuna delle pazienti incluse nello studio aveva effettuato terapie ormonali o aveva partorito nell'anno precedente lo studio, né presentava neoplasie maligne. Altri criteri di esclusione erano un pregresso intervento di chirurgia pelvica, la presenza di malformazioni uterine, patologie infiammatorie pelviche attuali o pregresse, alterazioni della coagulazione, condizioni generali non stabili.

All'inizio dello studio e al termine della terapia medica pre-chirurgica, le pazienti sono state sottoposte a visita ginecologica, ad ecografia transaddominale per calcolare le dimensioni del mioma, e agli esami ematologici di routine.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a miomectomia laparotomica. Gli interventi chirurgici sono stati effettuati sempre dalla stessa equipe di ginecologi con documentata esperienza in chirurgia ginecologica laparotomica. L'apertura dell'addome è stata effettuata con un'incisione secondo Pfannenstiel. L'isterotomia è stata effettuata in corrispondenza della porzione più prominente del mioma. L'enucleazione del mioma è stata effettuata lungo il piano di clivaggio tra il mioma ed il miometrio circostante. L'isterotomia è stata suturata in uno o due strati di punti staccati riassorbibili (Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ). Non sono stati utilizzati farmaci

vasocostrittori. I chirurghi non erano al corrente dell'eventuale pre-trattamento delle pazienti con GnRH-a.

Per ciascuna paziente abbiamo valutato il diametro del mioma, la durata totale dell'intervento chirurgico (dall'incisione della cute al completamento della chiusura della parete addominale) e la perdita ematica intraoperatoria. Quest'ultima è stata calcolata pesando le garze utilizzate ed aggiungendo al volume di sangue stimato la quantità raccolta con l'aspirazione. Il volume di soluzione di Ringer lattato utilizzato per l'irrigazione della pelvi è stato accuratamente valutato e sottratto dal volume di fluido raccolto nell'aspiratore. Non è stata considerata, ai fini della valutazione dell'emorragia intraoperatoria, la quantità di sangue persa durante l'apertura della parete addominale.

Al termine di ogni intervento, i chirurghi hanno dichiarato se era stato difficile individuare il piano di clivaggio tra il leiomioma ed il miometrio circostante.

In aggiunta alle pazienti arruolate nello studio, abbiamo considerato campioni paraffinati ottenuti in maniera retrospettiva da 20 pazienti in età premenopausale (10 trattate con GnRH-a e 10 non trattate) sottoposte ad isterectomia per fibromatosi uterina. Queste pazienti sono state randomizzate

dal database del nostro Istituto di Anatomia Patologica, allo scopo di valutare le caratteristiche del confine tra mioma e miometrio utilizzando la colorazione ematossilina-eosina.

Da ciascun leiomioma asportato sono stati ottenuti tre blocchi inclusi in paraffina e da ognuno di essi sono state tagliate sezioni seriali dello spessore di 4  $\mu\text{m}$ . Una sezione è stata colorata con ematossilina ed eosina ed esaminata per confermare la diagnosi originaria, escludendo le aree di necrosi.

Le sezioni ottenute dai leiomiomi sono state trattate con la tecnica di estrazione antigenica indotta dal calore mediante incubazione in forno a microonde a 650 W (tre passaggi sequenziali di quattro minuti ciascuno, in soluzione di citrato a 10 mM - pH 6.0), per lo smascheramento dell'antigene, e poi incubate per venti minuti a temperatura ambiente con 0.3% di perossido di idrogeno in metanolo, per attenuare la perossidasi endogena.

Per prevenire l'immunocolorazione aspecifica è stata eseguita un'ulteriore incubazione con siero di topo non immune (1:20, Dakopatts, Hamburg, Germania) diluito in PBS-albumina sierica bovina (1%) per 25 minuti. Dopo tre lavaggi con TRIS-soluzione salina, è stata effettuata una immunocolorazione con un anticorpo primario anti-PCNA (PC10, monoclonale, 1:200, DBA) per studiare l'espressione dell'antigene PCNA. Per

quanto riguarda la valutazione vascolare, è stata effettuata una immunocolorazione per il CD34, marker pan-endoteliale, utilizzando un anticorpo primario anti-CD34 (QBEnd 10 monoclonale di topo, 1:200; Dako).

Le sezioni sono state incubate per una notte a 4°C, in camera umida.

Dopo l'incubazione ed il lavaggio, le sezioni sono state incubate con anticorpi legati a biotina e streptavidina marcata con perossidasi (LSAB-HRP, Dako, Italia). Come soluzione di substrato cromogeno è stata utilizzata la 3,3 diaminobenzidina (DAB, Laboratori Vector, Burlingame, CA) con lo 0.3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo la colorazione nucleare con ematossilina, le sezioni sono state montate con mezzo sintetico (Entellan, Merck, Darmstadt, Germania).

L'espressione di PCNA è stata valutata osservando la colorazione nucleare delle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi. Soltanto le cellule con evidente colorazione sono state ritenute positive. L'espressione di PCNA è stata quindi definita utilizzando uno score semi-quantitativo: + (< 5% di cellule colorate), ++ (5-10% di cellule colorate), +++ (>10% di cellule colorate).

L'espressione di CD34 è stata valutata come colorazione citoplasmatica delle cellule endoteliali vascolari ed indicata come positiva o negativa. Il numero di vasi positivi per CD34, includendo anche i vasi mono-endotelizzati,

è stato determinato in almeno cinque diversi campi di aree rappresentative, ad ingrandimento  $100\times$  ( $0.25 \times 0.35$  mm).

Le sezioni sono state analizzate e l'immunocolorazione valutata senza che gli anatomo-patologi conoscessero i dati clinici delle pazienti.

Il test t di Student è stato utilizzato per lo studio delle variabili parametriche. Il livello di significatività statistica è stato posto per valori di  $p<0.05$ .

## *Risultati*

In accordo con valutazioni già pubblicate, le pazienti trattate hanno mostrato un significativo miglioramento dei parametri ematochimici ed una riduzione significativa del volume dei miomi dopo la terapia medica prechirurgica (tabella 3).

Il diametro medio dei miomi rimossi è risultato  $6.06 \pm 0.80$  [SD] cm nel gruppo GnRH-a.

I chirurghi hanno dichiarato che il piano di clivaggio tra i leiomiomi ed il miometrio circostante era chiaramente identificabile in 25 (86.2%) pazienti non trattate e in 14 (42.4%) pazienti trattate con GnRH-a.

Tuttavia, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella durata dell'intervento chirurgico tra i due gruppi (gruppo non trattato:  $60.93 \pm 22.01$  [SD] minuti, range 35-100 min; gruppo GnRH-a:  $68.82 \pm 17.78$  [SD] min, range 40-110 min).

Nel gruppo non trattato, la perdita ematica intraoperatoria media è risultata di  $213.79 \pm 139.47$  [DS] ml (range 30-550 ml). Essa è risultata significativamente più alta rispetto al gruppo GnRH-a ( $142.35 \pm 97.73$  [DS] ml, range 20-350 ml).

La colorazione con ematossilina-eosina dei campioni selezionati in maniera retrospettiva ha mostrato, in uteri di pazienti non trattate, un confine ben distinto tra il mioma ed il miometrio circostante. Questo confine appare meno definito ed evidente dopo trattamento prechirurgico con GnRH-a (figura 4).

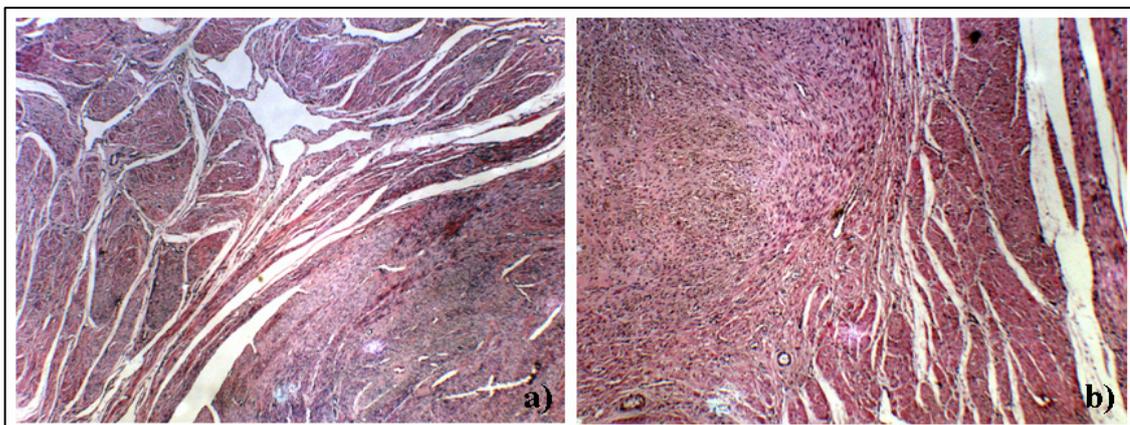
In tutti i leiomiomi non trattati è stata osservata una immunopositività per PCNA variabile tra ++ e +++, senza differenze legate alla topografia (pseudocapsula o centro della lesione) (figura 5a). Nei casi trattati, l'espressione di PCNA è risultata inferiore rispetto ai miomi non trattati, con una immunopositività variabile tra + e ++ alla periferia dei leiomiomi (figura 5b).

Nei leiomiomi non trattati, l'immunocolorazione per CD34 ha mostrato una evidente vascolarizzazione, costituita da vasi sanguigni con numerose anastomosi, soprattutto nella regione pseudocapsulare (numero medio di vasi sanguigni:  $51.28 \pm 6.67$  [DS] (range 40-60) (figura 5c). Nella stessa regione, i leiomiomi trattati hanno mostrato una significativa riduzione della vascolarizzazione (numero medio di vasi sanguigni:  $40.41 \pm 5.66$  [DS] (range 30-48) (figura 5d), con decremento del numero e della taglia dei vasi sanguigni.

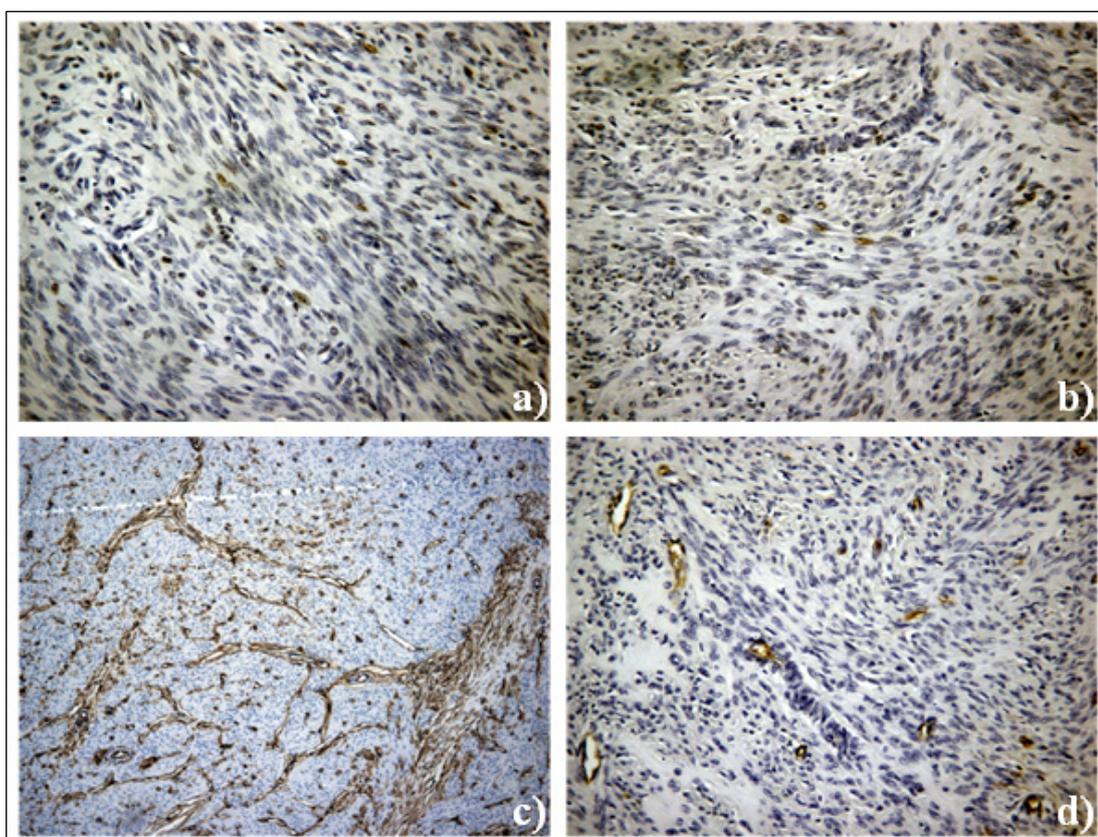
**Tabella 3.** Diametro del leiomioma e parametri ematologici prima e dopo la terapia pre-chirurgica.

Caratteristiche	Gruppo non trattato	Gruppo GnRH-a		
		<i>All'inizio dello studio</i>	<i>Dopo la terapia</i>	<i>p</i>
<b>Diametro medio del leiomioma (cm)</b>	7.58±0.8	7.64±0.7	6.06±0.80	<0.05
<b>Emoglobinemia (g/dL)</b>	9.7±1.5	9.9±1.3	12.2±1.6	<0.05
<b>Sideremia (µg/dL)</b>	40.2±7.3	39.1±7.5	77.3±5.1	<0.05

**Figura 4.** La pseudocapsula del leiomioma in un utero non trattato (a) ed in uno trattato con GnRH-a (b): si nota un confine indistinto tra il leiomioma ed il miometrio dopo la terapia medica pre-chirurgica (ingrandimento  $\times 150$ ).



**Figura 5.** a) Percentuale moderata-alta di cellule positive per PCNA in un mioma non trattato ( $\times 250$ ); b) Espressione di PCNA moderata-bassa in un mioma trattato con GnRH-a ( $\times 250$ ); c) Elevata densità di vasi CD34 positivi con numerose anastomosi alla periferia di un mioma non trattato ( $\times 106$ ); d) Evidente riduzione del diametro e della densità dei vasi sanguigni CD34 positivi in un mioma trattato con GnRH-a ( $\times 150$ ).



### *Discussione e conclusioni*

I leiomiomi uterini sono circondati da una pseudocapsula formata da una particolare distribuzione dei fasci periferici di fibrocellule muscolari lisce (112). Inoltre, con l'uso della microscopia elettronica, è stata descritta anche una capsula vascolare, formata da vasi più grandi, che attraversano la capsula provenendo dalla periferia della lesione, e da un'alta densità di capillari (113).

Frequentemente, i chirurghi osservano che il trattamento pre-chirurgico con i GnRH-a rende meno distinto il piano di clivaggio tra il leiomioma e la sua pseudocapsula, complicando tecnicamente la miomectomia.

Alcuni Autori (116, 117, 118) ritengono che l'utilizzo pre-chirurgico dei GnRH-a renda più difficile l'identificazione e la dissezione del piano di clivaggio tra il leiomioma e la pseudocapsula, sia nella miomectomia laparotomica che in quella laparoscopica.

Questa conclusione è in contrasto con quanto riportato da Vercellini et al (115), che non supportano la convinzione che la somministrazione pre-chirurgica dei GnRH-a renda la miomectomia tecnicamente più difficile o riduca la perdita ematica intraoperatoria.

Per la prima volta in letteratura, abbiamo valutato se il riscontro di un piano di clivaggio meno distinto tra il mioma ed il miometrio potesse essere messo in relazione con alcune modifiche morfologiche ed immunoistochimiche della pseudocapsula dopo somministrazione di GnRH-a.

Tutte le pazienti incluse nello studio sono state sottoposte a miomectomia laparotomica, sia per la sede e le dimensioni del mioma (lesioni intramurali, con diametro medio di circa 6 cm) che per la specifica esperienza dell'equipe chirurgica.

Secondo quanto riportato nel nostro studio, il piano di clivaggio tra il mioma ed il miometrio circostante non era chiaramente identificabile nella maggior parte delle pazienti pre-trattate, ma questo non ha rappresentato una difficoltà aggiuntiva per i chirurghi. Infatti, non abbiamo osservato un incremento significativo nella durata complessiva dell'intervento chirurgico ed abbiamo dimostrato una riduzione significativa della perdita ematica intraoperatoria. Probabilmente, anche l'esperienza e l'affiatamento dell'equipe chirurgica hanno influenzato questi risultati.

Inoltre, abbiamo anche valutato la possibile relazione tra queste osservazioni cliniche e chirurgiche e le caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche della pseudocapsula dei leiomiomi.

Lo studio istologico della pseudocapsula dei leiomiomi ha mostrato un confine poco distinto tra il mioma ed il miometrio nei casi pre-trattati. Questa potrebbe essere una possibile spiegazione del fatto che, nella maggior parte delle pazienti pre-trattate, i chirurghi non hanno immediatamente identificato il corretto piano di clivaggio tra leiomioma e miometrio.

I dati della letteratura relativi agli effetti del trattamento con GnRH-a sulla proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce dei leiomiomi uterini non sono univoci. L'esame istologico di routine dei leiomiomi non ha evidenziato modifiche nella proliferazione cellulare (76). D'altra parte, alcuni Autori hanno riportato una ridotta espressione degli antigeni Ki67 e/o PCNA (39,41), altri hanno dimostrato un significativo incremento nell'espressione di PCNA e di Ki67 dopo terapia con GnRH-a (77). In uno studio precedente (119), abbiamo riportato una riduzione dell'espressione di PCNA dopo terapia con GnRH-a, che però non raggiungeva il livello di significatività statistica rispetto ai leiomiomi non trattati. In questo studio, invece, abbiamo riscontrato una significativa riduzione nell'espressione di PCNA nelle aree periferiche dei leiomiomi. Ma, rispetto allo studio precedentemente citato, abbiamo considerato l'espressione di PCNA soltanto nella zona della pseudocapsula, non nell'intero mioma.

Un ridotto trofismo tissutale dovuto alla ridotta proliferazione cellulare nella regione periferica dei leiomiomi pre-trattati, potrebbe fornire una spiegazione almeno parziale per la perdita del piano di clivaggio tra il leiomioma ed il miometrio circostante.

Per quanto riguarda la vascolarizzazione dei leiomiomi, è stata riportata in letteratura una ridotta espressione di CD34 dopo somministrazione di GnRH-a (40,42). Nel presente studio, sottolineiamo come questa ridotta espressione sia più evidente nella pseudocapsula del mioma. Questa osservazione, insieme alla ridotta proliferazione cellulare, potrebbe spiegare la riduzione del piano di clivaggio tra il leiomioma ed il miometrio. Inoltre, la ridotta vascolarizzazione potrebbe contribuire a spiegare la riduzione della perdita ematica intraoperatoria osservata durante le miomectomie effettuate dopo pre-trattamento farmacologico.

In conclusione, questo braccio dello studio propone una relazione tra alcune osservazioni cliniche e chirurgiche e le modifiche immunohistochimiche della pseudocapsula dei leiomiomi uterini dopo trattamento pre-chirurgico con GnRH-a. L'osservazione di una ridotta proliferazione cellulare e di una diminuita vascolarizzazione della pseudocapsula potrebbe spiegare, almeno in

parte, il riscontro di un piano di clivaggio meno evidente tra il mioma ed il miometrio durante la miomectomia e la ridotta perdita ematica intraoperatoria.

Inoltre, i dati ottenuti supportano l'uso dei GnRH-a in casi ben selezionati, sottolineando come le modifiche del piano di clivaggio non comportino un significativo incremento della difficoltà chirurgica e della durata dell'intervento, se questo viene effettuato da uno staff di operatori esperti.

### *Pubblicazioni*

I risultati del secondo braccio dello studio sono oggetto delle seguenti pubblicazioni, di cui si allega copia:

1. De Falco M, Staibano S, Mascolo M, Mignogna C, Improda L, Ciociola F, Carbone IF, Di Lieto A. Leiomyoma pseudocapsule after pre-surgical treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists: relationship between clinical features and immunohistochemical changes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008, in press.
2. De Falco M, Staibano S, Pollio F, Ciociola F, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Pontillo M, Scaramellino M, Castaldo F, Schiraldi P, Di Lieto A. Effetti clinici ed immunoistochimici della terapia prechirurgica con GnRH-a e tibolone sulla pseudocapsula dei leiomiomi uterini. Congresso Straordinario AGUI. Roma, 18-19 maggio 2007, Abstract Book.
3. De Falco M, Staibano S, Pollio F, Mascolo M, Busiello A, Ciociola F, Carbone IF, Di Nardo MA, Pontillo M, Castaldo F, Di Lieto A. Modifiche della pseudocapsula dei leiomiomi uterini dopo terapia

prechirurgica con GnRH-a e tibolone e ripercussioni cliniche e chirurgiche. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Napoli, 14-17 ottobre 2007 - CD-ROM Abstract Book.

4. Carbone IF, De Falco M, Staibano S, Mascolo M, Mignogna C, Busiello A, Ciociola F, Di Nardo MA, Votino R, Di Lieto A. Leiomyoma pseudocapsule after pre-surgical medical treatment: immunohistochemical changes and clinical effects (Comunicazione). 9th International Symposium on GnRH "The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in cancer and reproduction". Berlino, Germania, 10-12 febbraio 2008, pag. 32.

5. Di Lieto A, De Falco M, Staibano S, Busiello A, Mascolo M, Carbone IF, Mignogna C, Castaldo F, Ciociola F, Di Nardo MA, Votino R. Leiomyoma pseudocapsule after pre-surgical medical treatment: immunohistochemical changes and clinical effects. *Gynecol Endocrinol* 2008;24(S1):138.

**Leiomyoma pseudocapsule after pre-surgical treatment  
with gonadotropin-releasing hormone agonists: relationship  
between clinical features and immunohistochemical  
changes.**

Marianna De Falco<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Massimo Mascolo<sup>2</sup>, Chiara  
Mignogna<sup>2</sup>, Luigi Improda<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Ilma F. Carbone<sup>1</sup>, Andrea Di  
Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine –  
University “Federico II” of Naples – Via S. Pansini, 5 – 80131 Naples, Italy

<sup>2</sup> Department of Biomorphological and Functional Science – University “Federico II” of Naples – Via  
S. Pansini, 5 – 80131 Naples, Italy

**Correspondence should be addressed to:**

Prof. Andrea Di Lieto  
Via Luca Giordano, 120  
80127 – Napoli (Italy)  
Telephone/fax: +39 081 746 2954  
E-mail: [dilieto@unina.it](mailto:dilieto@unina.it)

**Condensation**

Leiomyoma pseudocapsule changes after pre-operative GnRH-a could explain some clinical and surgical findings in laparotomic myomectomy.

**Leiomyoma pseudocapsule after pre-surgical treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists: relationship between clinical features and immunohistochemical changes.**

Marianna De Falco, Stefania Staibano, Massimo Mascolo, Chiara Mignogna, Luigi Improda,  
Francesca Ciociola, Ilma F. Carbone, Andrea Di Lieto

**Abstract**

**Objective:** To evaluate if pre-operative GnRH-a modify uterine leiomyoma pseudocapsule and the possible clinical effects of these changes.

**Study design:** The study was performed at the University Federico II of Naples on 33 premenopausal patients submitted to laparotomic myomectomy after treatment with triptorelin depot. 29 untreated patients formed the control group. The operating time, the intraoperative bleeding and the prompt identification of the cleavage plan between myoma and myometrium were evaluated. The pseudocapsule features and the immunoexpression of PCNA and CD34 in this area were studied.

**Results:** Treated patients showed lower blood loss and not clearly identifiable cleavage plan, but without any significant increase in the operating time. Treated lesions showed less evident border between myoma and myometrium and lower PCNA and CD34 pseudocapsule immunoexpression than untreated ones.

**Conclusion:** We propose the changes of leiomyoma pseudocapsule as partial explanations of the reported clinical and surgical findings after pre-operative GnRH-a.

**Key words:** cleavage plan; GnRH-a therapy; intraoperative blood loss; leiomyoma pseudocapsule; myomectomy.

**Introduction**

Uterine leiomyomas occur in about 25% of women over the age of 35 years and represent the most common cause of uterine surgery in premenopausal patients (1).

Leiomyoma growth and maintenance are stimulated by sex steroid hormones (2). Since 1980s, gonadotropin releasing hormone agonists (GnRH-a) have been used for the treatment of uterine leiomyomas. They reversibly suppress pituitary ovarian function, thus inducing a state of hypo-estrogenism that allows a temporary control of bleeding and a reduction in uterine and leiomyoma size. GnRH-a are beneficial in the correction of pre-operative iron deficiency anemia, reduce intraoperative blood loss and operating time and allow more conservative surgical interventions (1). Leiomyomas regain their original size within a few weeks after the end of medical therapy. This fact, together with the menopausal symptoms induced by the low estradiol levels, justify the prevalent use of GnRH-a as a pre-operative treatment in premenopausal women.

A problem frequently encountered in clinical practice but poorly researched, is that GnRH-a render surgical planes less distinct and this makes leiomyoma enucleation more difficult. Uterine leiomyomas are usually defined as well-capsulated benign neoforations. Actually, they are surrounded by a pseudocapsule, formed by a particular distribution of the bundles of smooth muscle cells of the more peripheral zone of the myoma and of the surrounding myometrium (3). During the development of leiomyoma, intense angiogenesis at the periphery leads to the formation of a “vascular capsule” responsible for blood supply to the growing myoma (4).

The relationship between clinical, surgical and histochemical effects of GnRH-a is well described in literature (5,6,7,8,9) but, at our knowledge, no report evaluated the specific immunohistochemical changes of leiomyoma pseudocapsule and their possible relationship with some clinical and surgical findings.

Aim of the present study was to evaluate the effects of the pre-operative treatment with GnRH-a on cell proliferation and vascularization of leiomyoma pseudocapsule and speculate if these changes could influence, at least in part, the modifications of the cleavage plan, the operating time and the intraoperative blood loss.

## **Materials and methods**

Thirty-three premenopausal women with single intramural symptomatic uterine leiomyoma referring during the years 2005-2007 to the Department of Obstetrical–Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine of the University “Federico II” of Naples were enrolled in the study group.

The patients (age  $37.3\pm 3.3$  [SD]; parity  $2.3\pm 1.1$  [SD]; BMI  $24.1\pm 4.9$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>; myoma mean diameter  $7.64\pm 0.7$  [SD] cm) (GnRH-a group) received 3.75 mg triptorelin depot in three monthly subcutaneous injections, starting within the first seven days of the menstrual cycle. After three weeks at most from the end of the therapy, all the patients underwent myomectomy.

Twenty-nine premenopausal women (untreated group) (age  $37.5\pm 3.1$  [SD]; parity  $2.4\pm 1.1$  [SD]; BMI  $25.4\pm 4.8$  [SD] Kg/m<sup>2</sup>; myoma mean diameter  $7.58\pm 0.8$  [SD] cm) did not receive any GnRH-a therapy and underwent surgery during the follicular phase of the menstrual cycle.

Each patient gave her informed consent to be enrolled in the study.

No patient in either group took hormonal therapy or delivered within 12 months of the study or had malignant neoplasm. Other exclusion criteria were previous pelvic surgery, uterine malformations, present or past pelvic inflammatory disease, coagulation disorders and unstable general conditions. Bimanual examination, transabdominal ultrasonography to calculate the myoma main diameter and routine hematological tests were performed at the beginning of the study and after the pre-surgical medical therapy.

Patients were submitted to laparotomic myomectomy. All procedures were performed by the same staff, with a documented experience in gynecological abdominal surgery. The abdomen was opened using a Pfannenstiel incision. Hysterotomy was carried out on the prominent part of the myoma.

Enucleation was made along the cleavage plan separating the myoma and the surrounding myometrium. The hysterotomy was closed in one or two layers, using separate stitches of resorbable

polyglactic acid sutures (Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ). Vasoactive drugs were not used. Surgeons were blinded to the pre-surgical medical treatment.

For each patient, we evaluated the myoma diameter, the total operating time (from skin incision to closure) and the intraoperative blood loss. The blood loss was estimated by weighing swabs and adding the estimated volume of blood to that removed by suction. The volume of lactated Ringer's solution used to irrigate the pelvis was estimated precisely and then subtracted from the fluid collected in the suction unit. The amount of blood loss during abdominal wall opening was not calculated.

At the end of the intervention, surgeons were asked to state if they promptly identified the cleavage planes between the leiomyoma and the surrounding myometrium or not.

In addition to the patients enrolled in the study, we also considered paraffin embedded samples obtained in a retrospective manner from twenty premenopausal patients (ten treated with GnRH-a and ten untreated patients) submitted to abdominal hysterectomy due to uterine fibromatosis. These patients were randomly selected from the database of our Pathology Unit, in order to evaluate the features of the border between myometrium and leiomyoma using an hematoxylin and eosin staining. For each leiomyoma, three paraffin blocks of representative areas were selected and 4 µm thick serial sections were cut from each block. One section was stained with hematoxylin and eosin to confirm the original diagnosis, excluding the areas of necrosis.

Sections from leiomyomas were pre-treated with a heat-induced antigen retrieval technique, with incubation in a 650W microwave oven (three sequential steps of 4 min each in citrate buffer (pH 6.0) 10 mM) for antigen unmasking and then incubated for 20 min at room temperature with 0.3% hydrogen peroxide in methanol, to quench the endogenous peroxidases.

Further incubation with non-immune mouse serum (1:20, Dakopatts, Hamburg, Germany) diluted in PBS-bovine serum albumin (1%) for 25 min was performed to prevent non-specific immunostaining. After three washing with TRIS saline buffer, immunostaining was performed for the study of the expression of PCNA using an anti-PCNA primary antibody (PC10, monoclonal, 1:200, DBA- Milan,

Italy). For that concerning the vascular evaluation, immunostaining for CD34, as a pan-endothelial marker, was performed with an anti-CD34 primary antibody (QBEnd 10 monoclonal mouse, 1:200; Dako, Carpinteria, CA).

Incubation was carried out overnight at 4°C, in a moist chamber. After incubation and washing, sections were incubated with biotinylated link antibodies and peroxidase-labeled streptavidine (LSAB-HRP, Dako, Italy). 3,3 Diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA) with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as substrate chromagen solution. After nuclear counterstaining with hematoxylin, sections were mounted with synthetic medium (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany). PCNA was observed as nuclear staining in leiomyomas smooth muscle cells. Only cells exhibiting a definite staining were judged as positive. PCNA expression was semi-quantitatively evaluated using the following score: + (< 5% of stained cells), ++ (5-10% of stained cells), +++ (>10% of stained cells).

CD34 was observed as cytoplasmic staining in blood vessels endothelial cells. CD34 expression was simply scored as negative or positive. The number of CD34 positive blood vessels, also including mono-endothelial ones, was determined in at least five different fields of representative areas, at 100x magnification (0.25 x 0.35 mm).

Sections were examined and immunostaining was graded without previous knowledge of the clinical data of the patients.

Statistical analysis was performed using the Student t test. Levels of statistical significance were set at *p*-values <0.05.

## Results

According with previous evaluations, treated patients showed significantly improved hematochemical parameters and reduced myoma volume after pre-surgical medical treatment (table 1).

The mean diameter of removed myomas resulted  $6.06 \pm 0.80$  [SD] cm in the GnRH-a group.

Surgeons stated that the cleavage plan between leiomyomas and surrounding myometrium was clearly identifiable in 25 (86.2%) untreated patients and in 14 (42.4%) GnRH-a treated patients.

Anyway, no significant difference in the operating time was found among the two groups (untreated group:  $60.93 \pm 22.01$  [SD] minutes, range 35-100 min; GnRH-a group:  $68.82 \pm 17.78$  [SD] min, range 40-110 min).

In the untreated group, the mean intraoperative blood loss was  $213.79 \pm 139.47$  [SD] ml (range 30-550 ml). It resulted significantly higher than in GnRH-a group ( $142.35 \pm 97.73$  [SD] ml, range 20-350 ml).

The hematoxylin and eosin staining on the retrospectively recruited samples showed, in uteri from untreated patients, a distinct border between myoma and surrounding myometrium. This border became not so clean and evident after pre-surgical treatment with GnRH-a (Figure 1).

An immunopositivity for PCNA ranging from ++ to +++ was detected in all untreated leiomyomas unrespect to the topography (pseudocapsule or centre) (Figure 2a). In treated cases, the expression of PCNA resulted lower in comparison with untreated ones, with an immunopositivity ranging between + and ++ at the periphery of myomas (Figure 2b).

In untreated myomas, CD34 immunostaining showed a prominent vascularization, constituted by anastomosing blood vessels, more evident in the pseudocapsule zone (mean vessel count:  $51.28 \pm 6.67$  [SD] (range 40-60) (Figure 2c). In the same area, treated leiomyomas showed significantly reduced vascularization (mean count:  $40.41 \pm 5.66$  [SD] (range 30-48) (Figure 2d), with decreased number and size of blood vessels.

## **Comment**

Uterine leiomyomas are surrounded by a pseudocapsule formed by a particular distribution of the peripheral bundles of smooth muscle cells (3). A vascular capsule, formed by larger vessels entering the capsule from the periphery and a high density of capillaries, has also been described using electron microscopy (4).

Frequently, surgeons observe that the pre-operative GnRH-a makes myomectomy more difficult, because the cleavage plan between leiomyoma and its pseudocapsule becomes less distinct. Some Authors (10,11,12) believe that the pre-operative use of GnRH-a may increase difficulties in identifying and dissecting the cleavage plan between leiomyoma and its pseudocapsule, both in abdominal and laparoscopic myomectomy. This conclusion is conflicting with a study of Vercellini et al (7), that does not support the idea that pre-operative administration of GnRH-a makes myomectomy more difficult or reduces the intraoperative blood loss.

For the first time in literature, we investigated if the finding of a less distinct cleavage plan between myoma and myometrium could be put in relationship with some morphological and immunohistochemical changes of the pseudocapsule.

All the patients enrolled in the present study underwent laparotomic myomectomy, both due to the myoma location and size (intramural lesions, with a mean diameter of about 6 cm) and to the specific skill of the surgical team.

We report that the cleavage plan between myoma and surrounding myometrium was not clearly identifiable in the majority of pre-treated patients, but this finding did not represent an additional difficulty for the surgeons: as a matter of fact, we did not observe any significant increase in the total operating time and demonstrated a reduced intraoperative bleeding. The skill and the cooperation of the surgeons probably influenced these results.

Then, we tried to evaluate the possible relationship between these clinical and surgical findings and some histological and immunohistochemical features of the leiomyoma pseudocapsule.

The histological evaluation of leiomyoma pseudocapsule showed a less defined border between myoma and myometrium in pre-treated cases. This could be a possible explanation for the fact that surgeons did not promptly identify the correct cleavage plan between myoma and myometrium in the majority of pre-treated patients.

Literature data about the effect of GnRH-a treatment on uterine leiomyoma cell proliferation are conflicting. Routine histological examinations of leiomyomas have failed to demonstrate changes in cell proliferation (13). On the other hand, some authors reported reduced expression of Ki67 antigen and/or PCNA antigen (14,15), some others found significant over-expression of PCNA and significant elevation of Ki67 after GnRH-a therapy (16). In a previous study (5), we found a reduction in PCNA expression after GnRH-a treatment, but it did not reach levels of statistical significance in comparison with untreated leiomyomas. In the present report, instead, we found a significant reduction in PCNA expression in the peripheral areas of leiomyomas. But in this study we considered PCNA expression only in the pseudocapsule and not in the whole leiomyoma.

A reduced tissular trophism due to the decreased cell proliferation in the peripheral areas of pre-treated leiomyomas could be at least a partial explanation for the loss of the cleavage plan between leiomyoma and surrounding myometrium.

As regards leiomyoma vascularization, a reduced CD34 expression after GnRH-a administration has been reported in literature (8,9). In the present study, we underline that this reduced expression is more evident in leiomyoma pseudocapsule. This observation, together with the decreased cell proliferation, could account for the loss of cleavage plan between myometrium and leiomyoma. Moreover, the reduced vascularization could contribute to explain the reduction of intraoperative blood loss found during myomectomies performed after medical pre-treatment.

In conclusion, the present report proposes a relationship between some clinical and surgical findings and the morphological and immunohistochemical changes of leiomyoma pseudocapsule after GnRH-a pre-operative treatment. The observation of a reduced cell proliferation and vascularisation of the

pseudocapsule zone could explain, at least in part, the less distinct cleavage plan found between myoma and myometrium during myoma enucleation and the reduced intraoperative bleeding.

### **Acknowledgments**

Special acknowledgments go to Dr. Fabrizio Pollio, for his precious contribution to the selection and management of the patients.

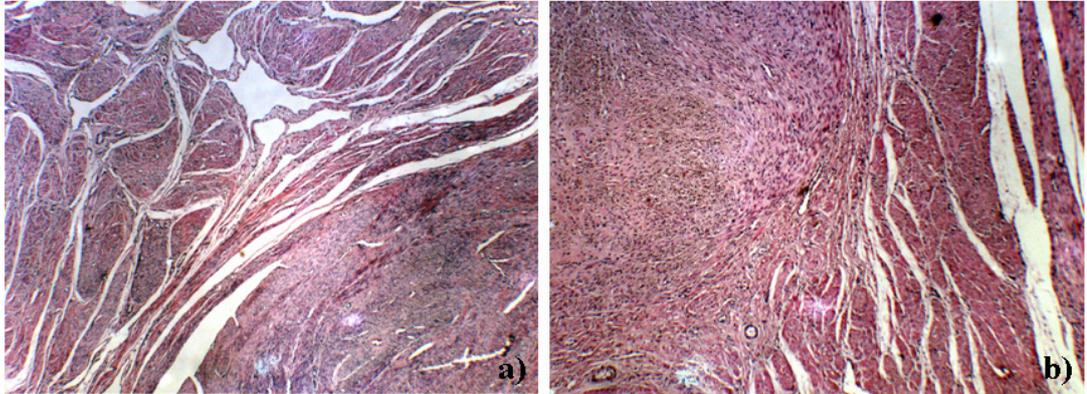
## References

- 1) Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *Cochrane Library* 2007; issue 4.
- 2) Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001; 357: 293-8.
- 3) Martius H, ed. *Trattato di Ginecologia*. Roma: Abruzzini Editore, 1953.
- 4) Walocha JA, Litwin JA, Miodoński AJ. Vascular system of intramural leiomyomata revealed by corrosion casting and scanning electron microscopy. *Hum Reprod* 2003; 18(5): 1088-93.
- 5) De Falco M, Staibano S, Pollio F, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen and bcl-2 during a pseudomenopausal state induced by pre-surgical treatment of uterine leiomyomas with gonadotropin-releasing hormone analogues plus tibolone. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24(3): 286-91.
- 6) De Falco M, Staibano S, D'Armiento FP, et al. Pre-operative treatment of uterine leiomyomas: clinical findings and expression of transforming growth factor-beta3 and connective tissue growth factor. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13(4): 297-303.
- 7) Vercellini P, Trespidi L, Zaina B, Vicentini S, Stellato G, Crosignani PG. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment before abdominal myomectomy: a controlled trial. *Fertil Steril* 2003; 79(6): 1390-5.
- 8) Di Lieto A, De Falco M, Staibano S, et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on uterine volume and vasculature and on the immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(4): 353-8.
- 9) Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, et al. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12(2): 123-8.

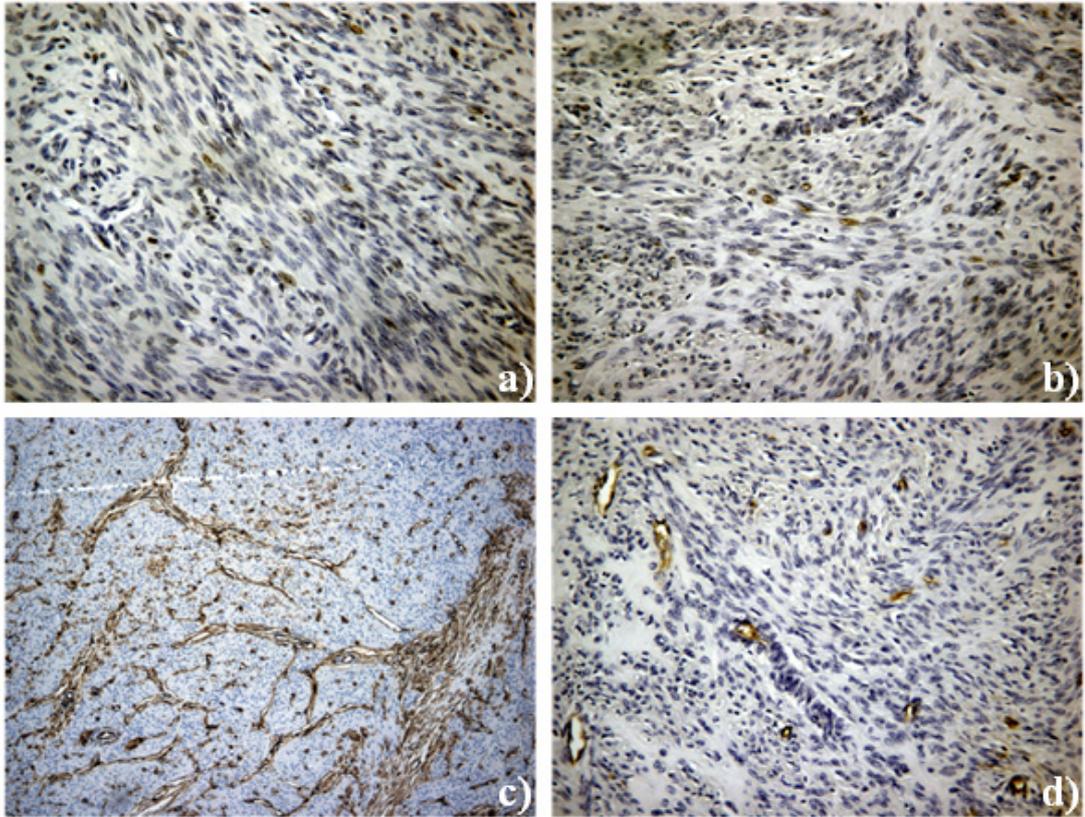
- 10) Dubuisson JB, Fauconnier A, Fourchette V, Babaki-Fard K, Coste J, Chapron C. Laparoscopic myomectomy: predicting the risk of conversion to an open procedure. *Hum Reprod* 2001; 16(8): 1726-31.
- 11) Beyth Y. Gonadotropin-releasing hormone analog treatment should not precede conservative myomectomy [letter]. *Fertil Steril* 1990; 53: 187-8.
- 12) Acien P, Quereda F. Abdominal myomectomy: results of a simple operative technique. *Fertil Steril* 1996; 65: 41-51.
- 13) Sreenan, JJ, Prayson RA, Biscotti CV, Thornton MH, Easley KA, Hart WR. Histopathologic findings in 107 uterine leiomyomas treated with leuprolide acetate compared with 126 controls. *Am J Surg Pathol* 1996; 20(4): 427-32.
- 14) Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K, Terada N. Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 84(4): 1253-5.
- 15) Vu K, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA, Kurman RJ. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and Bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol* 1998; 29: 359-63.
- 16) Huang SC, Chou CY, Lin YS, et al. Enhanced deoxyribonucleic acid damage and repair but unchanged apoptosis in uterine leiomyomas treated with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177(2): 417-24.

**Table 1.** Leiomyoma diameter and haematological parameters before and after the pre-operative treatment.

Characteristics	Untreated group	GnRH-a group		
		<i>At the admission</i>	<i>After therapy</i>	<i>p</i>
<b>Leiomyoma mean diameter (cm)</b>	7.58±0.8	7.64±0.7	6.06±0.80	<0.05
<b>Hemoglobin level (g/dL)</b>	9.7±1.5	9.9±1.3	12.2±1.6	<0.05
<b>Serum iron level (µg/dL)</b>	40.2±7.3	39.1±7.5	77.3±5.1	<0.05



**Figure 1.** Leiomyoma pseudocapsule in an untreated (a) and in a GnRH-a treated (b) uterus: note the indistinct border between leiomyoma and myometrium after the pre-operative medical treatment (magnification x150).



**Figure 2.** a) Moderate to high percentage of cells with nuclear staining for PCNA in a case of untreated leiomyoma (magnification  $\times 250$ ); b) Moderate to low expression of PCNA in a case of GnRH-a treated leiomyoma (magnification  $\times 250$ ); c) The CD34 immunostaining of blood vessels shows a dense vascularization with anastomosing vessels at the periphery of an untreated lesion (magnification  $\times 106$ ); d) Appreciable reduction of both the diameter and the density of CD34-immunostained blood vessels in a GnRH-a treated leiomyoma respect to the untreated cases (magnification  $\times 150$ ).

CONGRESSO STRAORDINARIO - Associazione Ginecologi Universitari Italiani (AGUI)

# Aggiornamenti in Ostetricia e Ginecologia

ROMA, 18-19 MAGGIO 2007  
Sheraton Golf Parco dei Medici

**PROGRAMMA  
SCIENTIFICO  
ED ABSTRACT BOOK**

*Presidente:  
Massimo Moscarini*



\*\*\*

#### **EFFETTI CLINICI ED IMMUNOISTOCHIMICI DELLA TERAPIA PRECHIRURGICA CON GnRH-A E TIBOLONE SULLA PSEUDOCAPSULA DEI LEIOMIOMI UTERINI.**

Marianna De Falco<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Filippo Castaldo<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli "Federico II";  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

**Obiettivo:** Valutare gli effetti clinici ed immunoistochimici della terapia prechirurgica con analoghi del GnRH (GnRH-a) e tibolone sulla pseudocapsula dei leiomiomi uterini.

**Disegno dello studio:** Lo studio è stato condotto su donne in età premenopausale con singolo mioma intramurale sintomatico di diametro compreso tra 4 e 7 cm. 17 pazienti (gruppo GnRH-a) furono trattate con leuprorelina acetato depot 3.75 mg per 4 mesi. 16 pazienti (gruppo GnRH-a più tibolone) effettuarono la stessa terapia più 2.5 mg di tibolone al giorno. Dopo il trattamento, le pazienti si sottoposero a miomectomia laparotomica. 29 donne (gruppo non trattato) furono direttamente operate. Per ogni paziente, abbiamo valutato la durata dell'intervento chirurgico e la perdita ematica intraoperatoria. Su ciascun mioma abbiamo studiato l'espressione immunoistochimica di PCNA e CD34 nelle aree periferiche e centrali della lesione.

Il test t di Student è stato utilizzato per comparare variabili parametriche. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per comparare variabili non parametriche. Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi.

**Risultati:** Nei casi trattati è stata rilevata una difficoltà nell'individuare il corretto piano di clivaggio per l'enucleazione del mioma, ma senza una significativa differenza nella durata dell'intervento chirurgico tra i tre gruppi. La perdita ematica intraoperatoria è risultata significativamente inferiore nelle pazienti trattate rispetto alle non trattate, senza differenze significative tra il gruppo GnRH-a e il gruppo GnRH-a più tibolone.

L'espressione di PCNA è risultata significativamente inferiore nei miomi trattati rispetto ai non trattati, senza differenze tra il centro e la periferia delle lesioni. La positività per CD34 variava da una estesa vascolarizzazione periferica nei miomi non

66

trattati a vasi di piccolo calibro in quelli trattati. I miomi trattati presentavano numerose aree di sclerosi, soprattutto nella zona centrale.

**Conclusioni:** La terapia prechirurgica dei leiomiomi uterini consente una riduzione della perdita ematica intraoperatoria, anche se risulta più difficile individuare un corretto piano di clivaggio per l'enucleazione del mioma. Tale dato potrebbe essere spiegato dalle modifiche nella proliferazione cellulare e, soprattutto, nella vascolarizzazione della pseudocapsula, che causano una riduzione della perdita ematica ma annullano anche il distinto confine tra il leiomioma ed il miometrio circostante osservato nelle lesioni non trattate.

\*\*\*

## MODIFICHE DELLA PSEUDOCAPSULA DEI LEIOMIOMI UTERINI DOPO TERAPIA PRECHIRURGICA CON GnRH-a E TIBOLONE E RIPERCUSSIONI CLINICHE E CHIRURGICHE

*Marianna De Falco<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Massimo Mascolo<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Filippo Castaldo<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

**Scopo:** Valutare le ripercussioni cliniche e chirurgiche delle modifiche morfologiche ed immunoistochimiche della pseudocapsula dei leiomiomi uterini dopo terapia prechirurgica con analoghi del GnRH (GnRH-a) e tibolone (1, 2).

**Materiali e metodi:** Lo studio è stato condotto su donne in età premenopausale con singolo mioma intramurale di diametro tra 5 e 7 cm. 17 pazienti (gruppo GnRH-a) furono trattate con leuprorelina acetato depot 3.75 mg per 4 mesi. 16 pazienti (gruppo GnRH-a più tibolone) effettuarono la stessa terapia più 2.5 mg di tibolone al giorno. Dopo il trattamento, le pazienti si sottoposero a miomectomia laparotomica. 29 donne (gruppo non trattato) furono direttamente operate.

Per ogni paziente, abbiamo valutato la durata dell'intervento chirurgico e la perdita ematica intraoperatoria. Su ciascun mioma abbiamo studiato l'espressione immunoistochimica di PCNA e CD34 nelle aree periferiche e centrali della lesione.

**Risultati:** Nei casi trattati è stata rilevata una difficoltà nell'individuare il corretto piano di clivaggio per l'enucleazione del mioma, ma senza una significativa differenza nella durata dell'intervento chirurgico tra i tre gruppi. La perdita ematica intraoperatoria è risultata significativamente inferiore nelle pazienti trattate rispetto alle non trattate, senza differenze significative tra il gruppo GnRH-a e il gruppo GnRH-a più tibolone.

L'espressione di PCNA è risultata significativamente inferiore nei miomi trattati rispetto ai non trattati, senza differenze tra il centro e la periferia delle lesioni. La positività per CD34 variava da una estesa vascolarizzazione periferica nei miomi non trattati a vasi di piccolo calibro in quelli trattati. I miomi trattati presentavano numerose aree di sclerosi, soprattutto nella zona centrale.

**Conclusioni:** La terapia prechirurgica dei leiomiomi uterini consente una riduzione della perdita ematica intraoperatoria, anche se risulta più difficile individuare un corretto piano di clivaggio per l'enucleazione del mioma. Tale dato potrebbe essere spiegato dalle modifiche nella proliferazione cellulare e, soprattutto, nella vascolarizzazione della pseudocapsula, che causano una riduzione della perdita ematica ma annullano anche il distinto confine tra il leiomioma ed il miometrio circostante osservato nelle lesioni non trattate.

### Bibliografia

- 1) Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Preoperative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. Cochrane Library 2001; issue 2.
- 2) Di Lieto A, De Falco M, Mansueto G, De Rosa G, Pollio F, Staibano S. Preoperative administration of GnRH-a plus tibolone to premenopausal women with uterine fibroids: evaluation of the clinical response, the immunohistochemical expression of PDGF, bFGF and VEGF and the vascular pattern. Steroids 2005; 70(2):95-102.



9<sup>th</sup> International Symposium on

# GnRH

The hypothalamic-pituitary-gonadal axis  
in cancer and reproduction

February 10 - 12, 2008, Berlin, Germany



**Under the auspices of:**

The International Society of Gynaecological Endocrinology  
The International Society for the Study of the Aging Male

**PROGRAM AND ABSTRACTS**

[www.kenes.com/gnrh](http://www.kenes.com/gnrh)

**LEIOMYOMA PSEUDOCAPSULE AFTER PRE-SURGICAL MEDICAL  
TREATMENT: IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES AND CLINICAL  
EFFECTS**

**I.F. Carbone<sup>1</sup>, M. De Falco<sup>1</sup>, S. Staibano<sup>2</sup>, M. Mascolo<sup>2</sup>, C. Mignogna<sup>2</sup>, A. Busiello<sup>1</sup>,  
F. Ciociola<sup>1</sup>, M.A. Di Nardo<sup>1</sup>, R. Votino<sup>1</sup>, A. Di Lieto<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina Della  
Riproduzione, Università Degli Studi di Napoli "Federico II", <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze  
Biomorfologiche e Funzionali, Università Degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli,  
Italy*

**Aims:** To evaluate if preoperative GnRH-a and tibolone modify uterine leiomyoma pseudocapsule and the possible clinical effects of these changes.

**Methods:** 17 premenopausal patients pretreated with leuprorelin acetate and 16 patients pretreated also with tibolone, underwent laparotomic myomectomy; 29 untreated patients formed the control group. The operating time, the intraoperative blood loss and the difficulty to identify the cleavage plan between myoma and myometrium were evaluated. The features of leiomyoma pseudocapsule and the immunohistochemical expression of PCNA and CD34 in this area were studied.

**Results:** Treated patients showed lower blood loss and not clearly identifiable cleavage plan, but without any significant difference in the operating time among the three groups. Treated lesions showed less evident border between myoma and myometrium and lower PCNA and CD34 pseudocapsular immunoexpression than untreated ones.

**Conclusions:** We highlight the advantages of preoperative GnRH-a and tibolone and propose the changes of leiomyoma pseudocapsule as partial explanations of the reported clinical findings.

a functional vagina and reported having a satisfactory sexual life in the follow up. Conclusions: The modified Abbè-McIndoe technique adopting autologous vaginal in vitro cultured tissue for the canal lining appears feasible, safe and easy.

## OP82

### GNRH AGONISTS AFTER LAPAROSCOPIC TREATMENT OF ENDOMETRIOSIS VS SURGERY ALONE

D. Tutunaru, R. Vladareanu, B. Alexandru, I. L. Condulescu, D.F. Lebit

*Elias Emergency Hospital, Romania*

**Aim:** to investigate the efficacy of medical treatment (GnRH agonists) after surgery versus surgery alone in infertile women with endometriosis. **Material and Methods:** ongoing, prospective, randomized, group controlled study. **Inclusion criteria:** patients willing to conceive for longer than 12 months, age between 20 and 35, with lesions of endometriosis revealed by laparoscopy, tubal patency demonstrated by chromopertubation, regular menses with presence of ovulation demonstrated by serial ultrasonography, having partners with normal sperm count. **Exclusion criteria:** adhesions, polycystic ovaries, uterine fibroids. From a total of 913 patients enrolled, 473 patients matched the inclusion criteria and were randomly divided in a study group of 244 and in a control group of 229 patients. In both groups all visible endometriotic lesions were destroyed by monopolar coagulation. The study group received a dose of 3.75mg triptoreline pamoat intramuscularly, once a month, for 3 months, while the control group didn't. **Primary objectives:** pregnancy in the first 12 months. **Secondary objectives:** remission of symptoms, lack of recurrence. **Results:** from the study group there was a pregnancy rate of 177 (72.5%) while 97 (42.3%) in the control group. The recurrence of symptoms was 19% (47 cases) in the study group and 23% (53 patients) in the study group.. **Conclusion:** medical treatment of endometriotic lesions which were not visible at the time of surgery (either because of their placement or because were in early stages of development) is far better than surgery alone in terms of pregnancy rate, remission of symptoms and recurrence of endometriosis.

## OP83

### LEIOMYOMA PSEUDOCAPSULE AFTER PRE-SURGICAL MEDICAL TREATMENT: IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES AND CLINICAL EFFECTS

A. Di Lieto (1), M. De Falco (1), S. Staibano (2), A. Busiello (1), M. Mascolo (2), I. F. Carbone (1), C. Mignogna (2), F. Castaldo (1), F. Ciociola (1), M. A. Di Nardo (1), R. Votino (1)

*(1)Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini, 5 - 80131 Napoli, Italia - (2) Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini, 5 - 80131 Napoli, Italy*

**Introduction:** Aim of the present study is to evaluate if preoperative GnRH-a and tibolone modify uterine leiomyoma pseudocapsule and the possible clinical effects of these changes. **Materials and methods:** 17 premenopausal patients pretreated with leuprorelin acetate and 16 patients pretreated also with tibolone, underwent laparotomic myomectomy; 29 untreated patients formed the control group. The operating time, the intraoperative blood loss and the difficulty to identify the cleavage plan between myoma and myometrium were evaluated. The features of leiomyoma pseudocapsule and the immunohistochemical expression of PCNA and CD34 in this area were studied. **Results:** Treated patients showed lower blood loss and not clearly identifiable cleavage plan, but without any significant difference in the operating time among the three groups. Treated lesions showed less evident border between myoma and myometrium and lower PCNA and CD34 pseudocapsular immunoeexpression than untreated ones. **Conclusions:** We highlight the advantages of preoperative GnRH-a and tibolone and propose the changes of leiomyoma pseudocapsule as partial explanations of the reported clinical findings.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Vollenhoven BJ, Healy DL. Pathophysiology and medical treatment of uterine fibroids. In: Cameron IT, Fraser IS, Smith SK, eds. Clinical disorders of the endometrium and menstrual cycle. Oxford: Oxford University Press, 1998:207-18
2. Kjerluff K, Guzinski G, Langenberg P. Hysterectomy rate and race. *Obstet Gynecol* 1993;82:757-64
3. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Efficacy of preoperative gonadotropin releasing hormones analogues for women with uterine fibroids undergoing hysterectomy or miomectomy: A systematic review. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:1097-108
4. Meloni AM, Surti U, Contento AM, Davare J, Sandberg AA. Uterine leiomyomas: cytogenetic and histologic profile. *Obstet Gynecol* 1992;80:209-17
5. Pandis N, Heim S, Bardi G, Floderus UM, Qillen H, Mandhal N et al. Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;55:11-8

6. Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein Szanto AJ, Outwater E, Brunner H et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 1999;59:4793-7
7. Andersen J. Factors in fibroid growth. *Baill Clin Obstet Gynaecol* 1998;12:225-43
8. Titman AJ. Smooth muscle neoplasms of the uterus. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1997;9:48-51
9. Andersen J, Barbieri RL. Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *J Soc Gynecol Invest* 1995;2:663-72
10. Andersen J, Dyreyes VM, Barbieri RL, Coachman DM, Miksicek RJ. Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures. *J Soc Gynecol Invest* 1995;2:542-51
11. Ichimura T, Kawamura N, Ito F, Shibata S, Minakuchi K, Tsujimura A et al. Correlation between the growth of uterine leiomyomata and estrogen and progesterone receptor content in needle biopsy specimens. *Fertil Steril* 1998;70:967-71

12. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimonura Y, Kurachi O, Gao Z et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2000;65:585-92
13. Andersen J. Growth factors and cytokines in uterine leiomyomas. *Semin Reprod Endocrinol* 1996;14:269-82
14. Stewart EA, Nowak RA. New concepts in the treatment of uterine leiomyomas. *Obstet Gynecol* 1998;92:624-7
15. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1179-84
16. Englund K, Lindholm B, Carlstrom K, Gustavsson I, Sjoblom P, Blanck A. Gene expression and tissue concentrations of IGF-I in human myometrium and fibroids under different hormonal conditions. *Mol Hum Reprod* 2000;6:915-20
17. Di Lieto A, Iannotti F, De Falco M, Staibano S, Pollio F, Ciociola F et al. Immunohistochemical detection of insulin like growth factor type I receptor and uterine volume changes in gonadotropin-releasing

hormone analog-treated uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(3):702-6

18. Barbarisi A, Petillo O, Di Lieto A, Melone MAB, Margarucci S, Cannas M et al.  $17\beta$ -estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2001;186:414-24
19. Di Lieto A, De Rosa G, De Falco M, Iannotti F, Staibano S, Pollio F et al. Relationship between platelet-derived growth factor expression in leiomyomas and uterine volume changes after gonadotropin releasing hormone agonist treatment. *Hum Pathol* 2002;33(2):220-4
20. Dixon D, Hong H, Haseman JK. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 5):795-802
21. Wu X, Blanck A, Olovsson M, Möller B, Linblom B. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1 and FGF receptor 2 in uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle, after menopause and GnRHa treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(6):497-504

22. Anania CA, Stewart EA, Quade BJ, Hill JA, Nowak RA. Expression of the fibroblast growth factor receptor in women with leiomyomas and abnormal uterine bleeding. *Mol Hum Pathol* 1997;3:685-91
23. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993;69:508-71
24. Myers ER, Barber MD, Gustilo-Ashby T, Couchman G, Matchar DB, McCrory DC. Management of uterine leiomyomata: what do we really know? *Obstet Gynecol* 2002;100:8-17
25. Manyonda I, Sinthamoney E, Belli AM. Controversies and challenges in the modern management of uterine fibroids. *Br J Obstet Gynaecol* 2004;111:95-102
26. Schulter MJ, Dwyer N, Byford S, Stirrat GM. Randomised trial comparing hysterectomy and transcervical resection: effect on health related quality of life and costs two years after surgery. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:142-9

27. Rannestad T, Eikeland O, Helland H, Quarnstrom U. The quality of life in women suffering from gynaecological disorders is improved by means of hysterectomy. *Acta Obstet Gynaecol Scan* 2001;80:46-51
28. Brown JS, Sawaya G, Thom DH, Grady D. Hysterectomy and urinary incontinence: a systematic review. *Lancet* 2000;356:535-9
29. Thakar R, Ayers S, Clarkson P, Stanton S, Manyonda I. Outcomes after total versus subtotal abdominal hysterectomy. *N Engl J Med* 2002;347:1318-25
30. Lumsden MA, Twaddle S, Hawthorn R, Traynor I, Gilmore D, Davis J et al. A randomised comparison and economic evaluation of laparoscopic assisted hysterectomy and abdominal hysterectomy. *Br J Obstet Gynecol* 2000;107:1386-91
31. Martin L, Benson RC. Pre-operative and post-operative care. In: Pemol RC, Benson RC, eds. *Current Obstetrics and Gynaecological Diagnosis and Treatment*, 6<sup>th</sup> edition. New York: Appleton & Lange, 1987:798
32. Carlson KJ, Miller BA, Fowler Jr FJ. The Maine Women's Health Study: I. Outcomes of hysterectomy. *Obstet Gynaecol* 1994;83:556-65

33. Miller CE. Myomectomy. Comparison of open and laparoscopic techniques. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2000;27(2):407-20
34. Seiner P, Arisio R, Decko A, Farina C, Crana F. Laparoscopic myomectomy: indications, surgical technique and complications. *Hum Reprod* 1997;12:1927-30
35. Dubuisson JB, Chapron C, Levy L. Difficulties and complications of laparoscopic myomectomy. *J Gynaecol Surg* 1996;12:159-65
36. Magos A, Bournas N, Sinha R, Richardson RE, O'Connor H. Vaginal myomectomy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:1092-4
37. Wang CJ, Yen CF, Lee CL, Song YK. Laparoscopic-assisted vaginal myomectomy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2000;7:510-4
38. Nezhat FR, Roemisch M, Nezhat CH, Seidman DS, Nezhat CR. Recurrence rate after myomectomy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:385-9
39. Vu K, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA, Kurkman RJ. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol* 1998;29:359-63

40. Di Lieto A, De Falco M, Staibano S, Iannotti F, Scaramellino M, Salvatore G et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on uterine volume and vasculature and on the immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in uterine leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22(4):353-8
41. Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K, Terada N. Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;84(4):1253-5
42. Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, Mansueto G, Salvatore G, Somma P et al. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. *J Soc Gynecol Invest* 2005;12(2):123-8
43. Lindsay PC, Shaw RW, Coelingh Bennink HJ, Kicovic P. The effect of add-back treatment with tibolone (Livial) on patients treated with the gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin (Decapeptyl). *Fertil Steril* 1996;65(2):342-8
44. Palomba S, Affinito P, Di Carlo C, Bifulco G, Nappi C. Long term administration of tibolone plus gonadotropin-releasing hormone agonist

for the treatment of uterine leiomyomas: effectiveness and effects on vasomotor symptoms, bone mass, and lipid profile. *Fertil Steril* 1999;72:889-95

45. Palomba S, Pellicano M, Affinito P, Di Carlo C, Zullo F, Nappi C. Effectiveness of short-term administration of tibolone plus gonadotropin-releasing hormone analogue on the surgical outcome of laparoscopic myomectomy. *Fertil Steril* 2001;75(2):429-33
46. Di Lieto A, De Falco M, Staibano S, Pollio F, Salvatore G, Pontillo M et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 during a pseudomenopausal state induced by presurgical treatment of uterine leiomyomas with gonadotropin-releasing hormone analogues plus tibolone. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24(3):286-91
47. Flierman PA, Oberyé' JJJ, van der Hulst VPM, de Blok S. Rapid reduction of leiomyoma volume during treatment with the GnRH antagonist ganirelix. *BJOG* 2005;112:638-42
48. Ravina JH, Herbretau D, Ciraru-Vigneron N, Bouret JM, Houdart E, Aymard A et al. Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 1995;346:671-2

49. Spies JB, Warren EH, Mathias SD, Walsh SM, Roth AR, Pentecost MJ. Uterine fibroid embolization: measurement of health-related quality of life before and after therapy. *J Vasc Interv Radiol* 1999;10:1293-303
50. Reidy JF, Bradley EA. Uterine artery embolization for fibroid disease. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998;21(5):357-60
51. Belli AM. Uterine artery embolization for the treatment of fibroids. *CME Radiol* 2002;3(1):20-5
52. Godfrey CD, Zaballa EA. Uterine necrosis after uterine artery embolisation for leiomyoma. *Obstet Gynecol* 2001;98:950-2
53. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4
54. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995;1:27-31
55. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64
56. Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P, Urdea MS et al. cDNA sequences and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 1986;320:695-9

57. Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifert RA, Smith RA, Ross R et al. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* 1988;240:1529-31
58. Mangrulkar RS, Ono M, Ishikawa M, Takashima S, Klagsbrun M, Nowak RA. Isolation and characterization of heparin-binding growth factors in human leiomyomas and normal myometrium. *Biol Reprod* 1995;53:636-46
59. Taniguchi Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T. Human uterine myometrial smooth muscle cell proliferation and vascular endothelial growth-factor production in response to platelet-derive growth factor. *J Endocrinol* 2001;169:78-86
60. Ishihara M, ShaKlee PN, Yang Z, Liang W, Wei Z, Stack RJ et al. Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor. *Glycobiol* 1994;4:451-8
61. Nowak RA. Identification of new therapies for leiomyomas: what in vitro studies can tell us. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):327-34
62. Presta M. Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: implication

- for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J Cell Physiol* 1988;137:593-7
63. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32
64. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82:864-73
65. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3:244-50
66. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman M. Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation of assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-7
67. Merenmies J, Parada LF, Henkemeyer M. Receptor tyrosine kinase in vascular development. *Cell Growth Differ* 1997;8:3-10
68. Ferrara N, Davis Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25

69. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5
70. Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnok-Jones DS, Smith SK. Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human myometrium and leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(6):1853-8
71. Stewart EA, Nowak RA. Leiomyoma-related bleeding: A classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Reprod Update* 1996;2:295-306
72. Conn G, Bayne M, Soderman L, Kwok PW, Sullivan, KA, Palisi TM et al. Amino acid and cDNA sequence of a vascular endothelial cell mitogen homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2628-32
73. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9
74. Di Lieto A, De Falco M, Mansueto G, De Rosa G, Pollio F, Staibano S. Preoperative administration of GnRH-a plus tibolone to

premenopausal women with uterine fibroids: evaluation of the clinical response, the immunohistochemical expression of PDGF, bFGF and VEGF and the vascular pattern. *Steroids* 2005;70(2):95-102

75. Cordon-Cardo C, Vlodysky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 1990;63(6):832-40
76. Sreenan JJ, Prayson RA, Biscotti CV, Thornton MH, Easley KA, Hart WR. Histopathologic findings in 107 uterine leiomyomas treated with leuprolide acetate compared with 126 controls. *Am J Surg Pathol* 1996;20(4):427-32
77. Huang SC, Chou CY, Lin YS, Tsai YC, Hsu KF, Liu CH et al. Enhanced deoxyribonucleic acid damage and repair but unchanged apoptosis in uterine leiomyomas treated with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(2):417-24
78. Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:293-9
79. Matsuo H, Kurachi O, Shimomura Y, Samoto T, Maruo T. Molecular bases for the action of ovarian sex steroids in the regulation of

- proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma. *Oncology* 1999;57(suppl 2):49-58
80. Khurana KK, Singh SB, Tatum AH, Schulz V, Badawy SZ. Maintenance of increased Bcl-2 expression in uterine leiomyomas after GnRH agonist therapy. *J Reprod Med* 1999;44(6):487-92
81. Valdivia I, Campodónico I, Tapia A, Capetillo M, Espinoza A, Lavin P. Effects of tibolone and continuous combined hormone therapy on mammographic breast density and breast histochemical markers in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2004;81(3):617-23
82. Gompel A, Siromachkova M, Lombet A, Kloosterboer HJ, Rostène W. Tibolone actions on normal and breast cancer cells. *Eur J Cancer* 2000;36(suppl 4):S76-S77
83. Gökaslan H, Öktem Ö, Durmuşoğlu F, Eren F. Apoptosis in the endometrium of postmenopausal women receiving tibolone. *Gynecol Obstet Invest* 2003;56:124-7
84. Gregoriou O, Vitoratos N, Papadias C, et al. A. Effect of tibolone on postmenopausal women with myomas. *Maturitas* 1997;27:187-91

85. Yang CH, Lee JN, Hsu SC, Kuo CH, Tsai EM. Effect of hormone replacement therapy on uterine fibroids in postmenopausal women: a 3-year study. *Maturitas* 2002;43(1):35-9
86. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:27-45
87. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor-B stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261:4337-45
88. Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Kore M, Hargrove JT, Matrisian LM et al. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92:7362-6
89. Ma C, Chegini N. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF- $\beta$ 1. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:950-4
90. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar IL et al. A new type of transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 3. *EMBO J* 1988; 7:3737-43

91. Arici A, Sozen I. Transforming growth factor- $\beta$ 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000; 73:1006-11
92. Chegini N, Ma C, Tang XM, Williams RS. Effects of GnRH analogues, "add-back" steroid therapy, antiestrogen and antiprogestins on leiomyoma and myometrial smooth muscle cell growth and transforming growth factor-beta expression. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(12):1071-8
93. Dou Q, Tamuzzer RW, Williams RS, Schultz GS, Chegini N. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in leiomyomata: a mechanism for gonadotropin releasing hormone agonist-induced tumor regression. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:1005-14.
94. Dou Q, Zhao Y, Tarnuzzer RW, Rong H, Williams RS, Schultz GS et al. Suppression of transforming growth factor-beta (TGF beta) and TGF beta receptor messenger ribonucleic acid and protein expression in leiomyomata in women receiving gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9):3222-30.

95. Pawar S, Kartha S, Toback FG. Differential gene expression in migrating renal epithelial cells after wounding. *J Cell Physiol* 1995; 165:556-65.
96. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(1):L68-76.
97. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Reviews* 1999; 20:189-206.
98. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: A cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991; 114:1285-94.
99. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993; 4:637-45.
100. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from

- localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106:729-33.
101. Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Fujii T, Luscher TF. Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 100:2108-12.
102. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin like growth factor binding protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidiasis. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1999; 21:693-700.
103. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53:853-61.
104. Igarashi A, Hayashi N, Nashiro K, Takehara K. Differential expression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1998; 25:143-8.
105. Uzumcu M, Al Homsy MF, Ball DK, Coskun S, Jaroudi K, Hollanders JMG et al. Localization of connective tissue growth factor in human uterine tissues. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(12):1093-8.

106. Weston G, Trajstman AC, Gargett CE, Manuelpillai U, Vollenhoven BJ, Rogers PAW. Fibroids display an anti-angiogenic pattern gene expression profile when compared with adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(9):541-9
107. Palomba S, Affinito P, Tommaselli GA, Nappi C. A clinical trial on the effects of tibolone association with gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998;70:111-8
108. Wiznitzer A, Marbach M, Hazum E, Insler V, Sharoni Y, Levy J. Gonadotropin releasing hormone specific binding sites in uterine leiomyomata. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1326-31.
109. Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S, Williams RS. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(9):3215-21.
110. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) and

- altered responses to the antiproliferative effects of TGF- $\beta$ . *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(2):913-20.
111. Frazier KS, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107:404-11.
112. Martius H. I tumori benigni dell'utero. In: Martius H, ed. *Trattato di Ginecologia*. Roma: Abruzzini Editore;1953:174-7.
113. Walocha JA, Litwin JA, Miodoński AJ. Vascular system of intramural leiomyomata revealed by corrosion casting and scanning electron microscopy. *Hum Reprod* 2003;18(5):1088-93.
114. De Falco M, Staibano S, D'Armiento FP, Mascolo M, Salvatore G, Busiello A et al. Preoperative treatment of uterine leiomyomas: clinical findings and expression of transforming growth factor-beta3 and connective tissue growth factor. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13(4):297-303
115. Vercellini P, Trespidi L, Zaina B, Vicentini S, Stellato G, Crosignani PG. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment before

abdominal myomectomy: a controlled trial. *Fertil Steril* 2003;79(6):1390-5

116. Dubuisson JB, Fauconnier A, Fourchette V, Babaki-Fard K, Coste J, Chapron C. Laparoscopic myomectomy: predicting the risk of conversion to an open procedure. *Hum Reprod* 2001;16(8):1726-31.
117. Beyth Y. Gonadotropin-releasing hormone analog treatment should not precede conservative myomectomy [letter]. *Fertil Steril* 1990;53:187-8.
118. Acien P, Quereda F. Abdominal myomectomy: results of a simple operative technique. *Fertil Steril* 1996;65:41-51.
119. De Falco M, Staibano S, Pollio F, Salvatore G, Pontillo M, Ciociola F et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen and bcl-2 during a pseudomenopausal state induced by presurgical treatment of uterine leiomyomas with gonadotropin-releasing hormone analogues plus tibolone. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24(3):286-91.

**Publicazioni relative alle linee di ricerca trattate  
nel corso del Dottorato di Ricerca in Riproduzione  
Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo e non inserite nel  
Programma di Ricerca oggetto della Tesi.**

1. Ciociola F, Pollio F, Postiglione L, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Bruno EM, Paduano M, Salzano S, Di Lieto A. In vitro effects of tibolone and its metabolites on MCF10 normal human breast epithelial cells. *It J Gynecol Obstet* 2007;19(1):21-4.
2. Pollio F, Postiglione L, De Falco M, Bruno EM, Paduano M, Salzano S, Carbone IF, Di Lieto A. In vitro effects of tibolone and its metabolites on human breast epithelial cells line, MCF10. 12th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence, March 2-5, 2006. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22 (suppl. 1):211
3. Ciociola F, Pollio F, Postiglione L, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Bruno EM, Paduano M, Salzano S, Pontillo M, Scaramellino M, Schiraldi P, Di Lieto A. Effetti in vitro del tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule epiteliali mammarie (MCF-10). *ATTI*

della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.

4. Ciociola F, Postiglione L, Pollio F, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Padano M, Salzano S, Castaldo F, Di Lieto A. Effetti del tibolone e dei suoi metaboliti sulla proliferazione cellulare, sul ciclo cellulare e sull'apoptosi delle cellule epiteliali mammarie normali (MCF10). Congresso Straordinario AGUI. Roma, 18-19 maggio 2007, Abstract Book.

5. Pollio F, Ciociola F, Postiglione L, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Paduano M, Salzano S, Castaldo F, Di Lieto A. Il tibolone ed i suoi metaboliti: studi in vitro sulle cellule epiteliali mammarie normali (MCF10). ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Napoli, 14-17 ottobre 2007 - CD-ROM Abstract Book.

6. Di Lieto A, Calarco A, Peluso G, Petillo O, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Castaldo F, Ciociola F, Di Nardo MA, Votino R. Antiproliferative and proapoptotic effects of tibolone and its metabolites on cultured uterine leiomyoma smooth muscle cells. *Gynecol Endocrinol* 2008;24(S1):172-3.

7. Di Lieto A, Flierman PA, De Falco M. GnRH agonists and antagonists in the preoperative therapy of uterine fibroids. 9th International Symposium on GnRH "The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in cancer and reproduction". Berlino, Germania, 10-12 febbraio 2008, pag. 34.
8. De Falco M, Pollio F, Pontillo M, Ambrosino E, Busiello A, Carbone IF, Ciociola F, Di Nardo MA, Landi L, Di Lieto A. GnRH agonists and antagonists in the preoperative therapy of uterine fibroids: literature review. *Minerva Ginecol* 2006;58(6):553-560.
9. Pollio F, Staibano S, Mascolo M, Salvatore G, Persico F, De Falco M, Di Lieto A. Uterine dehiscence in term pregnant patients with one previous caesarean delivery: growth factor immunoexpression and collagen content in the scarred lower uterine segment. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(2):527-34.
10. Pollio F, Staibano S, De Falco M, Buonocore U, De Rosa G, Di Lieto A. Severe secondary postpartum hemorrhage 3 weeks after cesarean section: Alternative etiologies of uterine scar non-union. *J Obstet Gynecol Res* 2007;33(3):360-2.

11. Pollio F, De Falco M, Di Nardo MA, Carbone IF, Busiello A, Ciociola F, Mascolo M, Mignogna C, Di Lieto A. La deiscenza uterina nella gravida a termine con taglio cesareo pregresso: immunoespressione dei growth factors e contenuto di collagene nella cicatrice del segmento uterino inferiore. Giornate scientifiche 2006, Università degli studi di Napoli "Federico II"
12. Pollio F, Di Nardo MA, De Falco M, Busiello A, Carbone IF, Ciociola F, Pontillo M, Scaramellino M, Schiraldi P, Di Lieto A. Il segmento uterino inferiore nel taglio cesareo pregresso: correlazione tra deiscenza uterina, contenuto di collagene ed immunoespressione dei fattori di crescita. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.
13. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Papa R, Torok M, Scaramellino M, Pontillo M, Pollio F, Spanik G, Schiraldi P, Bibbò G. Four years' experience with antepartum cardiotocography using telemedicine. J Telemed Telecare 2006;12(5):228-33.
14. Romano M, Bracale M, Cesarelli M, Campanile M, Bifulco P, De Falco M, Sansone M, Di Lieto A. Antepartum cardiotocography: a

study of fetal reactivity in frequency domain. *Comput Biol Med* 2006;36(6):619-33.

15. De Falco M, Pollio F, Carbone IF, Di Nardo MA, Ambrosino E, Busiello A, Ciociola F, Landi L, Di Lieto A. La telecardiotocografia computerizzata per il monitoraggio delle gravidanze a rischio: quattro anni di esperienza con il sistema TOCOMAT. Giornate scientifiche 2006, Università degli studi di Napoli "Federico II"

16. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Scaramellino M, Schiraldi P. Prenatal medicine: from the obstetric stethoscope to the computerized telecardiotocography. *Minerva Ginecol* 2007;59(1):75-84.

17. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Török M, Gábor S, Scaramellino M, Schiraldi P, Ciociola F. Regional and international prenatal telemedicine network for computerized antepartum cardiotocography. *Telemed J E Health*. 2008;14(1):49-54.

18. Di Lieto A, De Falco M, Carbone IF, Pollio F, Pontillo M, Busiello A, Ciociola F, Di Nardo MA, Schiraldi P, Scaramellino M. Progetto TOCOMAT di telecardiotocografia convenzionale e computerizzata: bilancio dei primi 5 anni di attività. *ATTI della Società*

Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.

19. Scaramellino M, De Falco M, Pollio F, Pontillo M, Busiello A, Carbone IF, Ciociola F, Di Nardo MA, Schiraldi P, Di Lieto A. Correlazione tra i parametri dell'analisi computerizzata di tracciati cardiotocografici patologici ed esito perinatale nell'ambito progetto TOCOMAT di telecardiotocografia convenzionale e computerizzata. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.

20. Di Lieto A, Campanile M, De Falco M. La Telemedicina Prenatale: Telecardiotocografia convenzionale e computerizzata. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Napoli, 14-17 ottobre 2007 - CD-ROM Abstract Book.

21. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Pollio F, Pontillo M, Busiello A, Ciociola F, Carbone IF, Di Nardo MA, Schiraldi P, Castaldo F. Progetto TOCOMAT di telecardiotocografia convenzionale e computerizzata: analisi dei primi sei anni di attività. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Napoli, 14-17 ottobre 2007 - CD-ROM Abstract Book.

22. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Török M, Gábor S, Scaramellino M, Schiraldi P, Ciociola F. Regional and international prenatal telemedicine network for computerized antepartum cardiotocography. *J Perinat Med* 2007;35(Suppl. II):148-9.
23. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Schiraldi P, Carbone IF, Busiello A, Ciociola F, Di Nardo MA, Votino R, Török M, Gábor S. Regional and international network for computerized antepartum cardiotocography. 20<sup>th</sup> European Congress of Obstetrics and Gynaecology. Lisbona, Portogallo, 4-8 Marzo 2008. *Acta Obstet Ginecol Port* 2008;S(1):63-4.
24. Pontillo M, Busiello A, Pollio F, De Falco M, Carbone IF, Ciociola F, Di Nardo MA, Schiraldi P, Scaramellino M, Staibano S, Di Lieto A. Sindrome eritrocitoso-fibromatosa: ruolo patogenetico dell'eritropoietina e del suo recettore nei miomi giganti. *ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Roma, 1-4 ottobre 2006 - CD-ROM Abstract Book.*
25. Ciociola F, Staibano S, De Falco M, Pollio F, Mascolo M, Busiello A, Carbone IF, Di Nardo MA, Castaldo F, Pontillo M, Di Lieto A. Tumore adenomatoide dell'utero trattato con GnRH-a:

considerazioni cliniche ed immunoistochimiche. ATTI della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Congresso di Napoli, 14-17 ottobre 2007 - CD-ROM Abstract Book.

26. Carbone IF, Di Nardo MA, Ciociola F, Busiello A, De Falco M, Improda L, Di Lieto A. Klippel-Tranaunay-Weber Syndrome (KTWS) and pregnancy: successful obstetrical management. 20th European Congress of Obstetrics and Gynaecology. Lisbona, Portogallo, 4-8 Marzo 2008. Acta Obstet Ginecol Port 2008;S(1):224.

## Effetti *in vitro* del tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule epiteliali mammarie umane normali (MCF10)

F. Ciociola<sup>1</sup>, F. Pollio<sup>1</sup>, L. Postiglione<sup>2</sup>, M. De Falco<sup>1</sup>, A. Busiello<sup>1</sup>, I.F. Carbone<sup>1</sup>, M.A. Di Nardo<sup>1</sup>, E.M. Bruno<sup>2</sup>, M. Paduano<sup>2</sup>, S. Salzano<sup>3</sup>, A. Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Cellulare e Molecolare e Patologia Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>3</sup>IEOS, Istituto di Endocrinologia Sperimentale e Oncologia (CNR) Università degli Studi di Napoli "Federico II"

### SOMMARIO

**Effetti *in vitro* del tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule epiteliali mammarie umane normali (MCF10).**

**Obiettivo:** obiettivo dello studio è testare *in vitro* gli effetti del tibolone e dei suoi metaboliti 3alfa-OH-tibolone, 3beta-OH-tibolone ed isomero delta 4 sulla proliferazione e sul ciclo cellulare di cellule epiteliali mammarie MCF10.

**Materiali e metodi:** le cellule MCF10 sono state coltivate nel Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1). Il tasso di proliferazione cellulare è stato valutato dopo stimolazione con tutti i composti a tre diverse concentrazioni (0,01 µM, 0,1 µM e 1 µM), a 24 e 48 ore. Il ciclo cellulare è stato studiato con citofluorimetria a 1, 3, 6, 9 e 12 ore dalla stimolazione con il tibolone e con i suoi metaboliti alla concentrazione di 1µM.

**Risultati:** la proliferazione cellulare si è ridotta dopo stimolazione con tibolone (1 µM), 3alfa-OH-tibolone e 3beta-OH-tibolone a 24 e 48 ore. Non è stato osservato alcun effetto sulla proliferazione dopo la stimolazione con l'isomero delta 4. L'analisi del ciclo cellulare non ha mostrato variazioni nelle fasi G1, S e G2+M dopo stimolazione con il tibolone e i suoi metaboliti alla concentrazione di 1 µM, rispetto ai controlli.

**Conclusioni:** il tibolone e i suoi metaboliti riducono la proliferazione delle cellule MCF10 senza aver alcun effetto sul ciclo cellulare.

**Parole chiave:** tibolone, mammella, menopausa, cellule mammarie MCF10.

### INTRODUZIONE

Il tibolone è uno steroide sintetico, derivato del 19-nortestosterone, che possiede pro-

### ABSTRACT

***In vitro* effects of tibolone and its metabolites on MCF10 normal human breast epithelial cells.**

**Objective:** aim of this study is to test the *in vitro* effects of tibolone and its metabolites 3alfa-OH-tibolone, 3beta-OH-tibolone and delta 4-isomer on proliferation and cell cycle of MCF10 normal human breast epithelial cells.

**Materials and methods:** MCF10 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1). Cell proliferation was measured after stimulation by all compounds at three different concentrations (0,01 µM, 0,1 µM and 1 µM) at 24 e 48 hours. Cell cycle was studied by cytofluorimetric analysis at 1, 3, 6, 9 and 12 hours after stimulation with tibolone and its metabolites at the concentration of 1 µM.

**Results:** cell proliferation decreased after stimulation with tibolone (1 µM), 3alfa-OH-tibolone and 3beta-OH-tibolone at 24 and 48 hours. No effect on proliferation was observed after stimulation with the delta 4-isomer. Cell cycle analysis did not show any variation in G1, S and G2+M phases at each time after stimulation with tibolone and its metabolites at the concentration of 1 µM in respect to the controls.

**Conclusions:** tibolone and its metabolites cause a decrease in MCF10 cell proliferation, but without any effect on their cell cycle.

**Key words:** tibolone, breast, menopausa, MCF10 breast cells.

prietà estrogeniche, progestiniche ed androgeniche. Tale farmaco viene utilizzato nelle donne in post-menopausa per il trattamento della sintomatologia climaterica e la prevenzione dell'osteoporosi (1). L'azione del tibolone è "tessuto-selettiva". In particolare, esso ha effetti di tipo estrogenico sul tessuto osseo e sulla mucosa vaginale, di tipo progestinico

Lavoro premiato all'82° Congresso Nazionale SIGO, Roma 2006

Corrispondenza: A. Di Lieto

© Copyright 2007, CIC Edizioni Internazionali, Roma

sull'endometrio e di tipo androgenico a livello epatico e sul cervello (2). A livello del tessuto ghiandolare mammario il tibolone inibisce la proliferazione cellulare mediante un meccanismo di regolazione enzimatica (non recettoriale, come invece avviene per il tamoxifene, che è un antiestrogeno). Più precisamente, il tibolone e i suoi metaboliti inibiscono la solfatasi e, quindi, impediscono la formazione di estrogeni attivi da precursori inattivi. Tale effetto inibitorio non si realizza, invece, a carico dell'osso, e questo conferma l'effetto favorevole del tibolone nella profilassi dell'osteoporosi post-menopausale (1).

Il tibolone non si lega con alta affinità a nessuno dei recettori steroidei, ma esprime la sua attività tramite metaboliti prodotti a livello epatico ed intestinale. Questi ultimi sono il 3alfa-OH-tibolone e il 3beta-OH-tibolone, che si legano al recettore degli estrogeni, e l'isomero delta 4, che si lega ai recettori del progesterone e degli androgeni (3).

Nel corso degli ultimi anni, l'utilizzo del tibolone per la terapia ormonale sostitutiva della menopausa ed i suoi potenziali effetti collaterali a carico della mammella sono stati oggetto di ampio interesse da parte della letteratura internazionale (4, 5).

Allo scopo di valutare l'effetto del tibolone sulla ghiandola mammaria, e per contribuire alla determinazione della sua sicurezza nel trattamento della sintomatologia climaterica, in questo lavoro abbiamo studiato gli effetti di tale steroide e dei suoi metaboliti sulla proliferazione e sul ciclo cellulare delle cellule MCF10, una linea cellulare epiteliale normale della mammella umana.

#### MATERIALI E METODI

Le cellule MCF10 sono state coltivate nel Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1), contenente 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina, 5% di Siero Bovino Fetale (FBS), 0.5 mg/ml di idrocortisone, 10 mg/ml di insulina e 0.02 mg/ml di Epidermal Growth Factor (EGF). La proliferazione cellulare è stata misurata con tecnica di colorazione con cristal violetto. Il tasso di proliferazione cellulare è stato valutato dopo stimolazione con tutti i composti a tre diverse concentrazioni (0,01 µM, 0,1 µM e 1 µM) a 24 e 48 ore. Lo stu-

dio del ciclo cellulare è stato realizzato con l'analisi citofluorimetrica. Il ciclo cellulare delle MCF10 è stato studiato a 1, 3, 6, 9 e 12 ore dalla stimolazione con il tibolone e con i suoi metaboliti alla concentrazione di 1 µM.

#### RISULTATI

È stata osservata una riduzione della proliferazione delle MCF10 dopo stimolazione con tibolone (1 µM) a 24 e 48 ore, rispetto ai controlli (Fig. 1a).

La stimolazione con 3alfa-OH-tibolone e 3beta-OH-tibolone ha determinato una riduzione della proliferazione delle MCF10 a 24 e a 48 ore, a ciascuna concentrazione, rispetto ai controlli (Figg. 1b e 1c).

Non è stato osservato alcun effetto sulla proliferazione dopo stimolazione con l'isomero delta 4 (Fig. 1d).

L'analisi del ciclo cellulare ha mostrato che le cellule MCF10 non presentano variazioni nelle fasi G1, S e G2+M dopo stimolazione con il tibolone e i suoi metaboliti alla concentrazione di 1 µM, rispetto ai controlli. I dati relativi alla stimolazione con tibolone sono mostrati in Figura 2.

#### DISCUSSIONE

Il tibolone è uno steroide che, grazie alle sue peculiari caratteristiche chimiche, è dotato di tessuto-specificità e selettivamente svolge un'attività estrogenica, progestinica e androgenica. Tale farmaco, il cui meccanismo di azione si esplica attraverso l'azione di metaboliti attivi, è attualmente in commercio per il trattamento della sintomatologia climaterica. L'interesse al trattamento con tibolone in alternativa alla terapia ormonale sostitutiva deriva dall'ipotesi che, data la tessuto-specificità, tale composto potrebbe opportunamente agire sui sintomi caratteristici della menopausa ovviando, o almeno riducendo i rischi connessi all'effetto proliferativo degli estrogeni sulla mammella.

Alcuni studi pubblicati in letteratura riportano che il tibolone, grazie alla sua attività di tipo progestinico sulla ghiandola mammaria, non ne stimola l'attività proliferativa, a differenza di quanto avviene con altri agenti utilizzati per la terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa (6). La mancanza di uno sti-

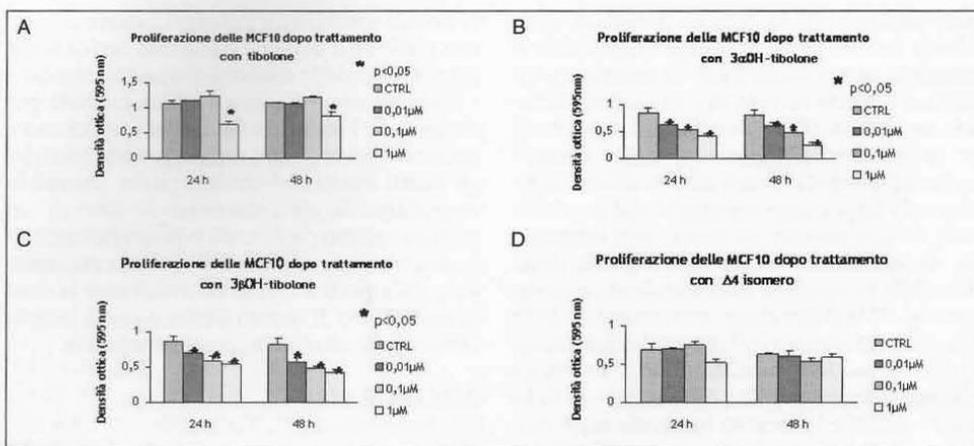


Figura 1. Proliferazione delle cellule MCF10 in seguito alla stimolazione con il tibolone (A), il 3alfaOH-tibolone (B), il 3betaOH-tibolone (C) e l'isomero delta 4 (D) a 0.01, 0.1 e 1 µM dopo 24 e 48 ore. CTRL = controlli.

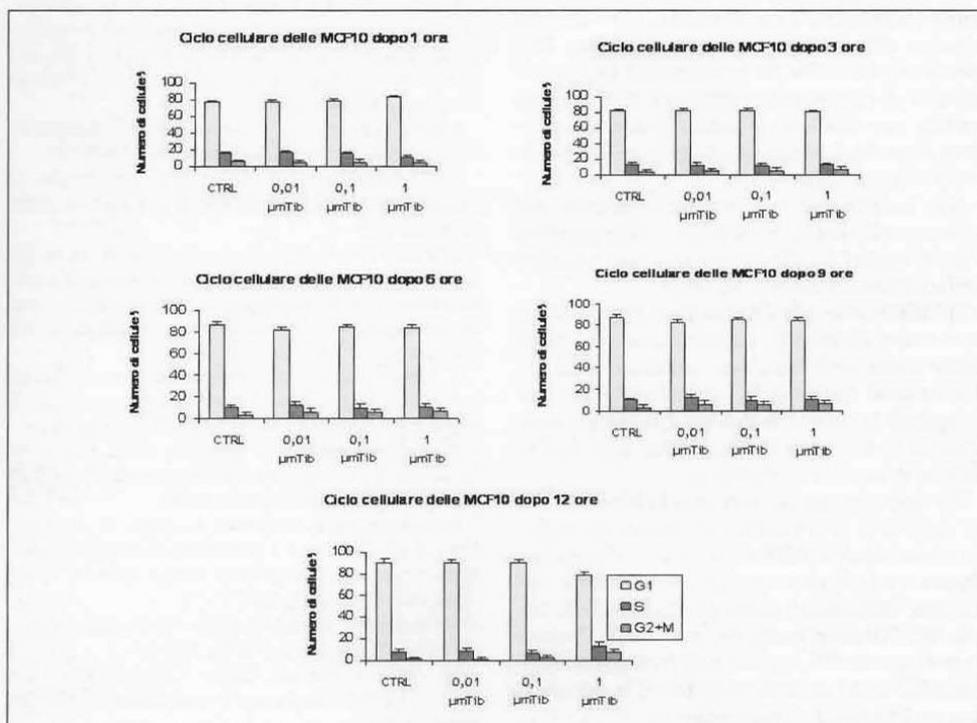


Figura 2. Ciclo cellulare delle MCF10 dopo stimolazione con tibolone (Tib) a 0.01, 0.1 e 1 µM dopo 1, 3, 6, 9 e 12 ore. La stimolazione con 3alfa-OH-tibolone, 3beta-OH-tibolone e isomero delta 4, alle stesse condizioni, induce gli stessi effetti sulla crescita cellulare (dati non mostrati). CTRL = controlli.

molo proliferativo sarebbe responsabile della ridotta incidenza di tensione mammaria e mastalgia osservata in corso di assunzione di tibolone rispetto ad altri tipi di terapia ormonale sostitutiva (7, 8), nonché dell'assenza di un incremento significativo della densità mammografica (4). Quest'ultimo effetto costituisce un importante vantaggio dal punto di vista dello screening del carcinoma mammario, in quanto un'augmentata densità della ghiandola mammaria potrebbe rendere meno agevole l'identificazione mammografica di eventuali neoplasie (9). Uno studio realizzato *in vivo* su modelli animali affetti o meno da carcinoma mammario ha dimostrato che il tibolone inibisce la crescita tumorale negli animali malati e non stimola la proliferazione cellulare in quelli sani (4).

Tra gli studi clinici che hanno valutato il ruolo della terapia ormonale sostitutiva classica e del tibolone nella patogenesi del carcinoma mammario è da segnalare, per l'elevato numero di pazienti arruolate, il *Million Women Study* (10), che ha evidenziato un rischio relativo di carcinoma mammario nelle donne trattate con tibolone significativamente inferiore rispetto a quello osservato con la terapia ormonale sostitutiva (11).

Alla luce di tali osservazioni cliniche, nel nostro studio abbiamo testato *in vitro* gli effetti proliferativi del tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule umane MCF10.

I risultati ottenuti dimostrano che il tibolone e i suoi metaboliti determinano una riduzione della proliferazione cellulare a carico dell'epitelio mammario normale, confermando quindi la diversità dell'effetto clinico sulla ghiandola mammaria rispetto ad altri tipi di terapia ormonale sostitutiva.

Più specificamente, non solo la proliferazione cellulare dell'epitelio ghiandolare mammario normale è ridotta, ma non si determina alcuna variazione neanche nelle singole fasi del ciclo cellulare: il comportamento delle cellule MCF10 non risulta modificato. Il tibolone e i suoi metaboliti, quindi, non inducono le cellule MCF10 ad entrare nella fase S e, pertanto, non ne influenzano la crescita.

L'assenza dello stimolo proliferativo sulla ghiandola mammaria consente di avviare ad uno dei principali aspetti negativi della terapia

ormonale sostitutiva e potrebbe indurre in futuro a preferire il tibolone come farmaco di scelta nel controllo della sintomatologia climaterica.

Sebbene siano necessari ulteriori studi per confermare i nostri risultati e per meglio caratterizzare i meccanismi molecolari alla base degli effetti clinici del tibolone sulla ghiandola mammaria, la dimostrazione *in vitro* di un mancato effetto proliferativo potrebbe costituire una ulteriore conferma di quanto già osservato nella pratica clinica ed avvalorare la sicurezza dell'uso di questo farmaco per la terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Kloosterboer HJ. Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas* 2004;48: S30-40.
2. Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem* 2001;76:231-8.
3. Markiewicz L, Gurpride E. In vitro evaluation of estrogenic, estrogen antagonistic and progestagenic effects of a steroidal drug (Org OD-14) and its metabolites on human endometrium. *J Steroid Biochem* 1990;35:535-54.
4. Kloosterboer HJ. Tissue-selective effects of tibolone on the breast. *Maturitas* 2004;49:S5-S15.
5. Kloosterboer HJ. Endocrine prevention of breast: any role for tibolone? *Eur J Cancer* 2002; 38(6):S24-S25.
6. Valdivia I, Campodonico I, Tapia A, et al. Effects of tibolone and continuous combined hormone therapy on mammographic breast density and breast histochemical markers in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2004;81:617-23.
7. Huber J, Palacios S, Berglund L, et al. The effect of tibolone compared with conjugated equine oestrogens continuously combined with medroxyprogesterone acetate on bleeding rates, quality of life and tolerability in postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:886-93.
8. Lundstrom E, Christow A, Svane G, et al. Effects of tibolone and a continuous combined HRT regimen on mammographic breast density. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:717-22.
9. Thurfjell E. Breast density and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:866.
10. Million Women Study Collaborators. The Million Women Study and breast cancer. *Maturitas* 2003; 46: 1-6.
11. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003;362:419-27.

## P76

### IN VITRO EFFECTS OF TIBOLONE AND ITS METABOLITES ON HUMAN BREAST EPITHELIAL CELLS LINE, MCF10

F. Pollio<sup>1</sup>, L. Postiglione<sup>2</sup>, M. De Falco<sup>1</sup>, E. M. Bruno<sup>2</sup>, M. Paduano<sup>2</sup>, S. Salzano<sup>3</sup>, I. F. Carbone<sup>1</sup>, A. Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrical-Gynecological and Urological Science and Reproductive Medicine;

<sup>2</sup>Department of Cellular and Molecular Biology and Pathology; <sup>3</sup>IEOS, Institute of Experimental Endocrinology and Oncology (CNR), University "Federico II" of Naples, Italy

Tibolone, a tissue-selective synthetic steroid with combined progestagenic, estrogenic and androgenic properties, is effective in treating climacteric complaints and to prevent bone loss in postmenopausal women. Tibolone itself does not bind with high affinity to any of the known steroid receptors. During passage through the intestine and liver, this compound is converted by  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ HSD) into its  $\Delta^4$  isomer or its  $3\beta$ -derivative and/or by  $3\alpha$ HSD into its  $3\alpha$ -reduced derivative. In contrast to tibolone, its metabolites bind several steroid receptors with higher affinity.

We tested the *in vitro* effects of Tibolone,  $3\alpha$ -OH-tibolone,  $3\beta$ -OH-tibolone and  $\Delta^4$ -isomer on MCF10 cells, a human normal breast epithelial cells line. We stimulated these cells with different concentrations (0.01  $\mu$ m, 0.1  $\mu$ m and 1  $\mu$ m) and evaluated cell rate proliferation after 24 and 48 hours. Then we studied MCF10 cell cycle after 1, 3, 6, 9 and 12 hours of stimulation with Tibolone and metabolites at 1  $\mu$ m concentration.

Obtained results showed a decrease of MCF10 proliferation after Tibolone stimulation (1  $\mu$ m) at 48 hours compared with controls. The stimulation with  $3\alpha$ -OH-tibolone and  $3\beta$ -OH-tibolone induced a decrease of MCF10 proliferation both at 24 and at 48 hours at each concentrations, respect to the controls. No effect on proliferation was observed after  $\Delta^4$ -isomer stimulation.

Cell cycle analysis showed no modification of MCF10 in G<sub>1</sub> S and G<sub>2</sub> + M phases at each time after stimulation with Tibolone and its metabolites at the concentration of 1  $\mu$ m compared with controls.

These preliminary data suggest that tibolone and its metabolites do not influence MCF10 behaviour.

## P77

### POSTMENOPAUSAL TRABECULAR BONE: SEM AND DEXA CORRELATIONS

G. Familiari<sup>1</sup>, F. Bove<sup>3</sup>, M. Relucanti<sup>1</sup>, R. Heyn<sup>1</sup>, F. Barberini<sup>1</sup>, F. Volpato<sup>3</sup>, C. Motta<sup>2</sup>, V. Toscano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and <sup>2</sup>Department of Medical Pathophysiology, University of Rome "La Sapienza", Rome, Italy; <sup>3</sup>Italian Neurotraumatologic Institute, Grottaferrata, Rome, Italy

In order to establish a relationship between bone mineral density (BMD) and the microarchitectural features of trabeculae in the cancellous bone, human femoral necks were studied by correlated scanning electron microscopy (SEM) and dual energy X ray absorptiometry (DEXA). Twenty-four postmenopausal women with hip arthrosis (age: 52 to 84) who underwent surgical hip substitution were studied. BMD was evaluated by DEXA before the surgical operation. SEM observations were performed on femoral neck biopsies. Our SEM observations did not throw a direct correlation with BMD data: Rod-like instead of plate-like trabeculae were observed in both normal and osteopenic samples according to T-score values. T-score was indeed partly related to trabecular architecture in terms of real three-dimensional bone consistency. Osteoporosis is generally defined according to measurements of BMD by DEXA. These measurements give the average concentration of calcium in scanned areas, thus quantifying bone mineral content (bone quantity) but not bone quality. In fact, BMD gives no information about bone microarchitecture, an important parameter when predicting fracture risk as stated by the NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis (2001). Although BMD measurement remains the most useful tool available to diagnose osteoporosis, this correlated SEM-DEXA study could further support the concept that the best knowledge of the true risk factor in postmenopausal age is related with both bone mineral content and bone microarchitecture. Supported by AILA Foundation.

## EFFETTI IN VITRO DEL TIBOLONE E DEI SUOI METABOLITI SULLE CELLULE EPITELIALI MAMMARIE (MCF10)

*Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Loredana Postiglione<sup>2</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Eugenia Maria Bruno<sup>2</sup>, Marianna Paduano<sup>2</sup>, Salvatore Salzano<sup>3</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione

<sup>2</sup> Università di Napoli "Federico II" - Dipartimento di Biologia Cellulare e Molecolare e Patologia,

<sup>3</sup> IEOS, Istituto di Endocrinologia Sperimentale e Oncologia (CNR), Napoli

**Scopo:** Il tibolone, steroide sintetico tessuto-selettivo con proprietà progestiniche, estrogeniche ed androgeniche, è utilizzato nel trattamento della sintomatologia climaterica. Abbiamo testato "in vitro" gli effetti del Tibolone e dei suoi metaboliti 3alfa-OH-tibolone, 3beta-OH-tibolone e isomero delta 4 sulle cellule MCF10, una linea cellulare epiteliale normale della mammella umana, per valutare eventuali modificazioni sulla proliferazione e sul ciclo cellulare indotti da questi composti.

**Materiali e metodi:** Le cellule MCF10 sono state coltivate nel Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1) contenente 100U/ml di Penicillina, 100 mg/ml di Streptomina, 5% di Siero Bovino Fetale (FBS), 0.5 mg/ml di Idrocortisone, 10 mg/ml di Insulina e 0.02 mg/ml di Epidermal Growth Factor (EGF). La proliferazione delle MCF10 è stata misurata con una tecnica di colorazione cristallo violetto. Il tasso di proliferazione cellulare è stato valutato dopo la stimolazione con tutti i composti a tre diverse concentrazioni (0,01µm, 0,1µm e 1µm) a 24 e 48 ore. Lo studio del ciclo cellulare è stato realizzato con l'analisi citofluorimetrica. Il ciclo cellulare delle MCF10 è stato studiato a 1, 3, 6, 9 e 12 ore dopo la stimolazione con il Tibolone e con i suoi metaboliti alla concentrazione di 1µm.

**Risultati:** I risultati mostrano una riduzione della proliferazione delle MCF10 dopo la stimolazione con Tibolone (1 µm) a 24 e 48 ore, rispetto ai controlli. La stimolazione con 3 alfa-OH-tibolone e 3 beta-OH-tibolone mostra una riduzione della proliferazione delle MCF10 a 24 e a 48 ore, a ciascuna concentrazione, rispetto ai controlli; non è stato osservato alcun effetto sulla proliferazione dopo la stimolazione con l'isomero delta 4. L'analisi del ciclo cellulare indica che le cellule MCF10 non presentano variazioni nelle fasi G1, S e G2+M dopo la stimolazione con il Tibolone ed i suoi metaboliti alla concentrazione di 1µm, rispetto ai controlli.

**Conclusioni:** Abbiamo testato "in vitro" gli effetti del Tibolone, del 3alfa-OH-tibolone, del 3beta-OH-tibolone e dell'isomero delta 4 sulle cellule MCF10. Il Tibolone ed i suoi metaboliti riducono la proliferazione delle cellule MCF10, senza aver alcun effetto sul ciclo cellulare. Inoltre, essi non influenzano il comportamento delle MCF10; infatti, non inducono queste cellule ad entrare nella fase S e quindi non influenzano la loro crescita.

CONGRESSO STRAORDINARIO - Associazione Ginecologi Universitari Italiani (AGUI)

# Aggiornamenti in Ostetricia e Ginecologia

ROMA, 18-19 MAGGIO 2007  
Sheraton Golf Parco dei Medici

**PROGRAMMA  
SCIENTIFICO  
ED ABSTRACT BOOK**

*Presidente:  
Massimo Moscarini*

\*\*\*

**EFFETTI DEL TIBOLONE E DEI SUOI METABOLITI SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE, SUL CICLO CELLULARE E SULL'APOPTOSI SULLE CELLULE EPITELIALI MAMMARIE NORMALI (MCF10).**

Francesca Ciociola, Loredana Postiglione, Fabrizio Pollio, Marianna De Falco, Anna Busiello, Ilma Floriana Carbone, Maria Antonietta Di Nardo, Marianna Paduano, Salvatore Salzano, Filippo Castaldo, Andrea Di Lieto  
*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione, <sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Cellulare e Molecolare e Patologia, <sup>3</sup>IEOS, Istituto di Endocrinologia Sperimentale e Oncologia (CNR), Università di Napoli "Federico II"*

Scopo: Il Tibolone, uno steroide sintetico tessuto-selettivo, è utilizzato nel trattamento della sintomatologia climaterica e nella prevenzione dell'osteoporosi in postmenopausa. Possiede attività estrogenica, progestinica ed androgenica e viene trasformato nel 3- e nel 3,-OH-tibolone che legano i recettori estrogenici e nel  $\Delta^4$ -isomero, che lega i recettori progestinici ed androgenici. Abbiamo studiato gli effetti del tibolone e dei suoi metaboliti sulla proliferazione e sul ciclo cellulare e sull'apoptosi delle cellule epiteliali mammarie (MCF10).

Disegno dello studio: Le MCF10 sono state coltivate nel Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1) contenente 100U/ml di Penicillin, 100 mg/ml di Streptomycin, 5% di Siero Bovino Fetale (FBS), 0.5 mg/ml di Idrocortisone, 10 mg/ml di Insulina e 0.02 mg/ml di Epidermal Growth Factor (EGF). La proliferazione cellulare era misurata con tecnica di colorazione cristallo violetto. Il tasso di proliferazione cellulare era valutato dopo la stimolazione con tutti i composti a tre concentrazioni (0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M) a 24 e 48 ore. Il ciclo cellulare è stato studiato a 1, 3, 6, 9 e 12 ore dopo la stimolazione con il Tibolone ed i suoi metaboliti a 1  $\mu$ M. Le MCF10 sono state trattate con i tre metaboliti contemporaneamente e l'apoptosi è stata misurata con la citometria.

Risultati: Dopo la stimolazione con Tibolone (1  $\mu$ M) a 24 e 48 ore vi è una riduzione della proliferazione delle MCF10, mentre con il 3- e 3,-OH-tibolone tale riduzione si ottiene a ciascuna concentrazione; non vi è effetto sulla proliferazione dopo stimolazione con l'isomero  $\Delta^4$ . Le cellule MCF10 non presentano nessuna variazione nelle fasi G1, S e G2+M a ciascun tempo dopo la stimolazione con il Tibolone ed i suoi metaboliti alla concentrazione di 1  $\mu$ M. Il tibolone ed i suoi metaboliti sono proapoptotici sulle MCF10 a 9 e 12 ore.

Conclusione: Abbiamo testato "in vitro" gli effetti del Tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule MCF10, studiando la proliferazione ed il ciclo cellulare e l'apoptosi. Abbiamo dimostrato che questi composti riducono la proliferazione delle cellule MCF10, mentre non hanno effetto sul loro ciclo cellulare. Il Tibolone ed i suoi metaboliti hanno effetti proapoptotici sulle cellule MCF10.

\*\*\*

**EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI FITOESTROGENI SULLA DENSITÀ MAMMARIA E SUI SINTOMI CLIMATERICI IN DONNE IN POSTMENOPAUSA.**

Virginia Gargano, Annalidia Sammartino, Wanda Attianese, Daniela Connola, Anna Masucci, Pierluigi Giampaolino, Ilaria Morra, Carmen Formisano, Mariangela Massaro, Giovanna Grasso, Costantino Di Carlo, Carmine Nappi  
*Dipartimento Universitario di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione-Università degli Studi di Napoli "Federico II".*

Obiettivo: lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto dei fitoestrogeni, in particolare della genisteina, sulla densità mammaria e sui sintomi climaterici in donne in postmenopausa.

Disegno dello studio: sono state arruolate 142 pazienti in postmenopausa suddivise in due gruppi, uno sottoposto a terapia con fitoestrogeni, l'altro sottoposto a placebo. Lo studio è stato condotto in doppio cieco. La presenza e la severità dei sintomi climaterici è stata valutata in ciascuna paziente con il Kupperman Index, mentre la densità mammaria è stata valutata mediante mammografia in proiezione mediolaterale obliqua destra e sinistra. La valutazione del Kuppermann Index e della densità mammaria sono state effettuate all'arruolamento e dopo 12 mesi.

Tutte le pazienti sono state sottoposte, inoltre, a valutazione del peso e dell'altezza al fine di determinare il BMI e a dosaggio plasmatico di FSH, LH e 17 beta estradiolo.

Risultati: alla valutazione effettuata dopo 12 cicli di trattamento, in tutti e due i gruppi di pazienti, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative dei valori del BMI e degli ormoni circolanti; sono state, invece, riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi dei parametri relativi alla sintomatologia climaterica che è risultata nettamente migliorata nel gruppo che assumeva fitoestrogeni rispetto al gruppo di pazienti trattato con placebo.

Dopo 12 cicli di trattamento, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative della densità mammaria nelle pazienti sottoposte a terapia con fitoestrogeni rispetto a quelle trattate con placebo.

Conclusioni: la terapia con fitoestrogeni determina un significativo miglioramento della sintomatologia climaterica in assenza di incremento della densità mammaria.

\*\*\*

**VALUTAZIONE DEL BLEEDING IN PAZIENTI IN POSTMENOPAUSA SOTTOPOSTE A TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA CON DIFFERENTI DOSI DI PROGESTERONE NATURALE SOMMINISTRATO PER VIA ORALE O PER VIA VAGINALE.**

Annalidia Sammartino, Virginia Gargano, Wanda Attianese, Daniela Connola, Anna Masucci, Pierluigi Giampaolino, Ilaria Morra, Carmen Formisano, Mariangela Massaro, Giovanna Grasso, Costantino Di Carlo, Carmine Nappi  
*Dipartimento Universitario di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione-Università degli Studi di Napoli "Federico II".*

Obiettivo: valutare gli effetti della somministrazione di differenti dosi di progesterone naturale micronizzato (PN) per via orale o vaginale in schema di terapia ormonale sostitutiva (HRT) sequenziale continua sul bleeding mensile in donne in postmenopausa.

**IL TIBOLONE ED I SUOI METABOLITI: STUDI IN VITRO SULLE CELLULE EPITELIALI MAMMARIE NORMALI (MCF10)**

*Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Loredana Postiglione<sup>2</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Marianna Paduano<sup>2</sup>, Salvatore Salzano<sup>3</sup>, Filippo Castaldo<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione, <sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Cellulare e Molecolare e Patologia, <sup>3</sup>IEOS, Istituto di Endocrinologia Sperimentale e Oncologia (CNR), Università di Napoli "Federico II"

**Scopo:** Il Tibolone, uno steroide sintetico tessuto-selettivo, è utilizzato nel trattamento della sintomatologia climaterica e nella prevenzione dell'osteoporosi in postmenopausa (1). Possiede attività estrogenica, progestinica ed androgenica e viene trasformato nel 3 $\alpha$ - e nel 3 $\beta$ -OH-tibolone che legano i recettori estrogenici e nel  $\Delta^4$ -isomero, che lega i recettori progestinici ed androgenici (2). Abbiamo studiato gli effetti del tibolone e dei suoi metaboliti sulla proliferazione, sul ciclo cellulare e sull'apoptosi delle cellule epiteliali mammarie (MCF10).

**Materiali e metodi:** Le MCF10 sono state coltivate nel Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1) contenente 100U/ml di Penicillin, 100 mg/ml di Streptomycin, 5% di Siero Bovino Fetale (FBS), 0.5 mg/ml di Idrocortisone, 10 mg/ml di Insulina e 0.02 mg/ml di Epidermal Growth Factor (EGF). La proliferazione cellulare era misurata con tecnica di colorazione cristallo violetto. Il tasso di proliferazione cellulare era valutato dopo la stimolazione con tutti i composti a tre concentrazioni (0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M) a 24 e 48 ore. Il ciclo cellulare è stato studiato a 1, 3, 6, 9 e 12 ore dopo la stimolazione con il Tibolone ed i suoi metaboliti a 1  $\mu$ M. Le MCF10 sono state trattate con i tre metaboliti contemporaneamente e l'apoptosi è stata misurata con la citometria.

**Risultati:** Dopo la stimolazione con Tibolone (1  $\mu$ M) a 24 e 48 ore vi è una riduzione della proliferazione delle MCF10, mentre con il 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -OH-tibolone tale riduzione si ottiene a ciascuna concentrazione; non vi è effetto sulla proliferazione dopo stimolazione con l'isomero  $\Delta^4$ . Le cellule MCF10 non presentano nessuna variazione nelle fasi G1, S e G2+M a ciascun tempo dopo la stimolazione con il Tibolone ed i suoi metaboliti alla concentrazione di 1  $\mu$ M. Il tibolone ed i suoi metaboliti sono proapoptotici sulle MCF10 a 9 e 12 ore.

**Conclusioni:** Abbiamo testato "in vitro" gli effetti del Tibolone e dei suoi metaboliti sulle cellule MCF10, studiando la proliferazione ed il ciclo cellulare e l'apoptosi. Abbiamo dimostrato che questi composti riducono la proliferazione delle cellule MCF10, mentre non hanno effetto sul loro ciclo cellulare. Il Tibolone ed i suoi metaboliti hanno effetti proapoptotici sulle cellule MCF10.

**Bibliografia**

- 1) Kloosterboer HJ. Tissue-selectivity: the mechanism of action of Tibolone. *Maturitas* 2004;48:S30-40.
- 2) Kenemans P. Tibolone: how does its mechanism of action translate into clinical effects. *Maturitas* 2004;48(1):S1-3.

dyspareunia) and had a sonographic finding of a posterior deep pelvic endometriotic nodule. Treatment used to suppress ovarian function were GnRH agonists in 6 patients, add back therapy in 9 patients, contraceptive steroids continuously in 5 and insertion of levonorgestrel intrauterine system in 2 patients. All the patients underwent transvaginal and transrectal sonography for DIE. A comparison between dimensions and sonographic characteristics of the endometriotic nodules before and during medical therapy was performed. RESULTS: During medical therapy symptoms were completely relieved in 16 patients and in the others significantly alleviated. We observed during therapy a decrease of the maximum diameter ( $28.1 \pm 6.8$  vs.  $24.2 \pm 7.9$  mm) and in total volume ( $3.4 \pm 2.4$  cm<sup>3</sup> vs.  $2.3 \pm 1.5$  cm<sup>3</sup>) of the endometriotic nodule, which however were not statistically significant. None of the nodules disappear during therapy, echostructure and infiltration of the surrounding tissue remains substantially unchanged. CONCLUSIONS: Medical therapy for DIE relief pain and limit growth and activity of endometriosis however endometriotic lesion does not disappear or reduced in volume and extension during therapy.

## OP159

### TREATMENT OF INFERTILE WOMEN WITH UTERINE MYOMA

L. Nacu, S. Deminet, M. Znacovan  
*Medical Privat Cente, Russia*

Uterine fibroids, smooth muscle tumours of the uterus, are found in at least 25 to 35% of women over the age of 35 years. Although some of these tumours are asymptomatic, up to 50% cause symptoms severe enough to warrant therapy and surgery is the standard treatment. Fibroid growth is stimulated by oestrogen and gonadotropin releasing hormone agonists (GnRH<sub>a</sub>) which induce a state of hypoestrogenism have been investigated as a potential treatment. GnRH<sub>a</sub> treatment causes fibroids to shrink but cannot be used long term because of unacceptable symptoms and bone loss. This study investigated the efficacy of Diferelin depot 3.75 mg (Triptorelin, Beaufour Ipsen International) during a 3-month treatment of infertile patients with uterine myomas of different size and location. The investigation comprised 24 patients aged 24-40 years. Diferelin depot was administered every 28 days for 3 months with ultrasonographic follow-up of volume decrease. The obtained results point to efficacy of Diferelin in decreasing the volumes of both myomas and uterus by more than 30-40%, which correlates with literature data. Serum concentrations of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (E2) were followed-up prior to and during Diferelin therapy where multivariate variance analysis showed statistically significant differences. The use of GnRH analogues for 3 to 4 months reduce both uterine volume and fibroid size. They are beneficial in the correction of pre-operative iron deficiency anaemia, if present, and reduce intra-operative blood loss. The side effects were recorded and are similar to those of other GnRH analogues.

## OP160

### ANTIPROLIFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFECTS OF TIBOLONE AND ITS METABOLITES ON CULTURED UTERINE LEIOMYOMA SMOOTH MUSCLE CELLS

A. Di Lieto (1), A. Calarco (2), G. Peluso (2), O. Petillo (2), M. De Falco (1), A. Busiello (1), I. F. Carbone (1), F. Castaldo (1), F. Ciociola (1), M. A. Di Nardo (1), R. Votino (1)

(1) Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli Federico II - (2) Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli, Italy

INTRODUCTION: Tibolone is effective in treating climacteric complaints. It is used in association with GnRH-a also for leiomyoma treatment. It remains to clarify whether Tibolone itself or its  $\Delta 4$ -isomer derivatives,  $3\beta$ -OH-tibolone and  $3\alpha$ -OH-tibolone, possesses the ability to modulate leiomyoma cell growth. Aim of this study is to test the in vitro anti-proliferative and pro-apoptotic effects of Tibolone and its metabolites on cultured fibroid smooth muscle cells. METHODS: Uterine leiomyoma and normal adjacent myometrial tissues were dissected from endometrial cell layers, cut into small pieces and digested in 2mg/ml collagenase type I at 37°C for 3-5 h. Cells were collected by centrifugation and plated in culture dishes in complete DMEM. To determine whether Tibolone had any anti-proliferative effect, the cells were treated with vehicle or increasing concentrations (1, 10, 50  $\mu$ M) of Tibolone or its derivatives ( $3\beta$ -OH-tibolone and  $3\alpha$ -OH-tibolone). Cell growth was measured after 48 h of incubation. RESULTS: Tibolone itself inhibited leiomyoma cell growth in a dose-dependent manner compared to vehicle alone. The anti-proliferative effect of Tibolone was potent as well as its derivatives since >50% inhibition was achieved with 10  $\mu$ M of all the compounds tested. On the contrary,

there was no visible increase in the number of apoptotic cells in cultured cells, irrespective of the presence or absence of Tibolone, while there was a significant increase of apoptosis in presence of its derivatives. **CONCLUSIONS:** Tibolone and its metabolites showed antiproliferative effects on uterine leiomyomas, while a pro-apoptotic activity is demonstrated only for the metabolites.

## OP161

### UTEROVAGINAL ANASTOMOSIS IN CONGENITAL AGENESIS OF THE UTERINE CERVIX ASSOCIATED WITH VAGINAL ATRESIA

L. Frigerio, E. Rota, G. Gallo, G. Trezzi  
*OORR BG, Italy*

Congenital agenesis of the uterine cervix associated with vaginal aplasia and a functioning endometrium is a rare variant of the Rokitansky syndrome. We report a case of a 15 years old girl who we treated with conservative surgery to preserve fertility and to avoid physical and psychological difficulties.

## OP162

### CYTOGENETIC STUDY OF COUPLES WITH RECURRENT SPONTANEOUS ABORTIONS AND INFERTILE PATIENTS WITH RECURRENT IVF/ICSI FAILURE

A. Mohseni Meybodi (1,2), H. Mozdarani (1) Sh. Zari Moradi (2)

1. *Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran* 2. *Department of Infertility Genetics, Royan Institute, Tehran, Iran.*

There are substantial evidences that genetic alterations are contributing factors to the risk for recurrent miscarriages. This study was conducted to determine the frequency and contribution of chromosomal abnormalities in miscarriages and in couples with recurrent IVF/ICSI failure. We studied a total of 221 individuals; 79 with three or more recurrent spontaneous abortions and 142 with at least three IVF/ICSI failures. Chromosomal analysis from peripheral blood lymphocytes were performed according to standard cytogenetic methods using G-banding technique. Abnormal karyotype was found in 21(9.50%) individuals. Of these 21 subjects, 4(19.04%) exhibited sex chromosomal abnormalities and 17(80.96%) had autosomal abnormalities. Male partners had significantly higher chromosomal abnormalities (5.88%) than of females (3.61%). These abnormalities were also higher in patients with recurrent spontaneous abortions than with IVF/ICSI failure. ( $p < 0.05$ ). Recent research has indeed documented that both syndromes can be caused by the same embryonic chromosomal abnormalities. Thus, cytogenetic analysis should be recommended in couples with recurrent IVF/ICSI failure or miscarriages, when clinical data fail to clarify the cause.

## OP163

### MATERNAL THROMBOPHILIA AND PLACENTAL FAILURE IN PREVIOUSLY UNEXPLAINED STILLBIRTH

M. J. Simchen, O. Moran, A. Kedem, K. Ofir, E. Schiff

*Department of Obstetrics and Gynecology, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Tel Aviv University, Israel*

Antenatal stillbirth is an extremely distressing experience for parents and caretakers. Associated risk factors include maternal (obesity, HTN, diabetes, infectious), fetal (structural and karyotype) and cord/placental causes. Nevertheless, up to 50% of cases remain unexplained. Our aim was to evaluate whether a systematic investigation plan focusing on placental/prothrombotic causes may reduce the proportion of unexplained stillbirth cases. A prospective workup protocol for women after stillbirth from 2006 included an assessment of maternal risk factors, fetal anomalies, placental and cord anomalies, infection, and a detailed thrombophilia screening (FV Leiden, FIIG20210A, MTHFR, Protein C, Protein S, Antithrombin, LAC, ACL antibodies). IUGR was defined as birth weight <10th percentile. Placental abruption was defined by clinical presentation and gross appearance, placental infarcts were determined from histopathology reports.



9<sup>th</sup> International Symposium on

# GnRH

The hypothalamic-pituitary-gonadal axis  
in cancer and reproduction

February 10 – 12, 2008, Berlin, Germany



**Under the auspices of:**

The International Society of Gynaecological Endocrinology

The International Society for the Study of the Aging Male

**PROGRAM AND ABSTRACTS**

[www.kenes.com/gnrh](http://www.kenes.com/gnrh)

## **GnRH AGONISTS AND ANTAGONISTS IN THE PREOPERATIVE THERAPY OF UTERINE FIBROIDS**

**A. Di Lieto<sup>1</sup>, P.A. Flierman<sup>2</sup>, M. De Falco<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina Della Riproduzione – Università Degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy, <sup>2</sup>Department of Gynaecology, Obstetrics and Reproductive Medicine, OLVG, Amsterdam, The Netherlands*

**Aims:** aim of this lecture is to present our data about the effects of the preoperative treatment of uterine fibroids with GnRH-agonist, alone or plus tibolone, on cell proliferation, apoptosis, vascularization and some growth factor expression in uterine leiomyomas and myometrium. Moreover, preliminary data about the clinical, histological and immunohistochemical evaluation of myoma and myometrium slides obtained from patients treated with GnRH-antagonist at the Department of Gynaecology, Obstetrics and Reproductive Medicine, OLVG of Amsterdam, will also be presented.

**Methods:** evaluations have been made on samples obtained from premenopausal women submitted to surgery for symptomatic uterine fibromatosis. Patients were treated preoperatively with GnRH-agonist, alone or plus tibolone, or with GnRH-antagonist.

**Results:** the immunohistochemical analysis of fibroid samples obtained from patients treated with GnRH-agonist alone showed a decrease in cell proliferation, in vascularization and in the expression of the most common peptidic growth factors. In samples obtained from patients treated with GnRH-agonist plus tibolone, we found similar results, but with a significant increase in apoptosis respect to patients treated with GnRH-agonist alone. Samples from GnRH-antagonist treated patients did not show any univocal feature, even if related to a significant shrinkage of uterine and myoma volume; anyway, we noted an overall higher vascularization and cell proliferation in comparison with GnRH-agonist treated cases.

**Conclusions:** if confirmed by further studies, our data could contribute to a better knowledge of the mechanism by which GnRH-analogs, and particularly GnRH-antagonists, induce uterine and fibroid volume shrinkage and give new information about the pathogenesis of uterine fibromatosis.

## Agonisti e antagonisti del GnRH nella terapia pre-chirurgica della fibromiomas uterina

Review della letteratura

M. DE FALCO, F. POLLIO, M. PONTILLO, E. AMBROSINO, A. BUSIELLO, I. F. CARBONE, F. CIOCIOLA  
M. A. DI NARDO, L. LANDI, A. DI LIETO

GNRH AGONISTS AND ANTAGONISTS IN THE  
PREOPERATIVE THERAPY OF UTERINE FIBROIDS:  
LITERATURE REVIEW

**Uterine leiomyomas are the most frequent gynecological benign tumors. Their growth is regulated by ovarian steroids, therefore a hypoenestrogenic state, like menopause or pharmacologically induced pseudo-menopause by GnRH-agonists or GnRH-antagonists, is associated with the decrease of their volume. This volume reduction allows a less invasive surgical procedure and may reduce the amount of blood loss during surgery. Therefore, GnRH-agonists and antagonists are used in presurgical treatment of uterine fibromatosis. This review analyses the effects of GnRH-agonists and GnRH-antagonists therapies. GnRH-agonists produce a down-regulation of GnRH receptor, while GnRH-antagonists compete with endogenous GnRH for pituitary binding sites. Due to the lack of any intrinsic activity of GnRH-antagonists, the characteristic initial flare-up observed with GnRH-agonist treatment is absent. So, GnRH-antagonists rapidly suppress gonadotropin release within 4-8 h, while GnRH-agonists show clinical effects after 2 or 3 weeks of treatment. GnRH-antagonist activity is dose-dependent so it is possible to adjust the dose to obtain the proper levels of inhibition. The GnRH-agonist presurgical treatment usually is a short-term therapy (3-6 months), because it causes side-effects like menopause symptoms.**

Pervenuto il 13 dicembre 2005.  
Accettato 24 luglio 2006.

Indirizzo per la richiesta di estratti: Prof. A. Di Lieto, Via Luca Giordano 120, 80127 Napoli. E-mail: dilieto@unina.it

*Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche e  
Urologiche e Medicina della Riproduzione  
Università Federico II di Napoli, Napoli*

**GnRH-antagonist clinical effects can be achieved with a short-time therapy too. Their side-effects include flushes and head-ache. After stopping therapy with both drugs, leiomyomas rapidly achieve their original size while side-effects disappear. Further studies are necessary to establish the use of GnRH-antagonists in leiomyomas therapy, but in Italy this is not possible because their use is not approved.**

**Key words: Uterine fibroids - Reproductive medicine - GnRH, analogues and derivatives - GnRH-agonists - GnRH-antagonists.**

I fibromi uterini rappresentano le più comuni neoplasie benigne delle donne in età riproduttiva. La loro incidenza è di circa il 25-50% nelle donne di età superiore a 30 anni, aumenta con l'età delle pazienti ed è maggiore nelle popolazioni Afro-Caraibiche<sup>1,2</sup>. I miomi possono essere causa di menorragia, dolore pelvico, infertilità e aborti ricorrenti. Essi rappresentano la più comune indicazione all'intervento di isterectomia.

La fibromiomas uterina può presentare caratteri di familiarità. In circa il 50% dei miomi si osservano anomalie citogenetiche. Le mutazioni più frequenti sono rappresentate da traslocazioni dei bracci lunghi dei cromosomi 12 e 14, con conseguente attivazio-

ne di un gene promuovente la proliferazione (HMG-C), e da delezioni nel braccio lungo del cromosoma 7, con conseguente perdita di un gene soppressore della proliferazione cellulare.

È ormai riconosciuto che la crescita dei miomi è stimolata dagli steroidi ovarici; essi, infatti, diminuiscono di volume in menopausa e negli stati pseudo-menopausali indotti dalle terapie con gli analoghi del gonadotropin-releasing hormone (GnRH), mentre tendono a riacquistare le loro dimensioni originali alla sospensione di tali trattamenti. Inoltre, l'aumento dell'indice mitotico osservato nei miomi durante la fase luteale del ciclo mestruale suggerisce che la loro crescita è stimolata, oltre che dagli estrogeni, anche dal progesterone<sup>3,4</sup>. I recettori per gli estrogeni e per il progesterone sono iperespressi nel tessuto miomatoso rispetto al miometrio sano<sup>4,6</sup>. Gli effetti biologici degli steroidi ovarici sono mediati da numerosi fattori di crescita polipeptidici prodotti localmente che agiscono con meccanismo endocrino, paracrina e autocrino<sup>7</sup>.

Numerose ipotesi scientifiche sostengono che i fibromi possono essere causa di infertilità. Si suppone che essi possano ostacolare la migrazione del gamete maschile lungo il suo percorso verso le tube; inoltre, l'ingrandimento dell'utero e la distorsione del suo profilo potrebbero ostacolare l'impianto dell'embrione<sup>8</sup>. La presenza di fibromi potrebbe causare disfunzioni della contrattilità uterina con conseguente alterazione della migrazione degli spermatozoi, del trasporto dell'ovulo o dell'annidamento. I miomi possono causare un difetto dell'impianto dovuto a disturbi della vascolarizzazione focale endometriale, a infiammazione endometriale, a secrezione di sostanze vasoattive o a un aumentato clima androgenico endometriale<sup>8</sup>.

I miomi uterini possono interferire con il decorso della gravidanza. In particolare, essi possono essere causa di abortività qualora una gravidanza sia impiantata su fibromi sottomucosi, o anche intramurali.

I rischi e i benefici delle diverse opzioni terapeutiche esistenti vanno valutati nel programmare il trattamento clinico dei fibromi uterini. Il trattamento da seguire va scelto in-

sieme alla paziente, considerando il suo desiderio di gravidanza, i sintomi presenti, la sede e la dimensione dei fibromi, i rapporti costo-beneficio dei diversi trattamenti e, inoltre, l'impatto dei trattamenti sulla qualità della vita.

### **Modalità di trattamento della fibromiomas uterina**

Il trattamento chirurgico rimane a tutt'oggi l'unica possibilità di terapia risolutiva della fibromiomas uterina sintomatica. Esso si impone nei casi in cui gli episodi di menometrorragia sono frequenti e non controllabili con la sola terapia medica ovvero nei casi in cui il volume dell'utero e/o dei fibromi raggiunga dimensioni tali da causare dolore pelvico o compressione di organi vicini (vescica, ureteri e/o intestino). Un'altra indicazione alla chirurgia è rappresentata dalla necessità di rimuovere un fibroma che per la sua sede possa compromettere la fertilità. L'approccio chirurgico può essere conservativo o demolitivo, addominale o vaginale, laparotomico o laparoscopico. Attualmente si tende sempre più a minimizzare l'invasività degli interventi chirurgici cercando di privilegiare, quando possibile, le strategie conservative. Tali obiettivi vengono spesso raggiunti con l'aiuto di terapie farmacologiche prechirurgiche volte a ridurre le dimensioni dell'utero e dei fibromi e a migliorare le condizioni cliniche della paziente. La scelta del tipo di terapia dipende da vari fattori: la presenza e l'entità della sintomatologia, l'età della paziente, l'eventuale desiderio di gravidanze, il volume del fibroma. In caso di fibroma non voluminoso, in assenza di sintomi, può essere sufficiente tenere una condotta di attesa, limitandosi a controlli clinici periodici. Al contrario, in una paziente sintomatica, vanno attuate strategie terapeutiche farmacologiche o, più frequentemente, chirurgiche.

Le terapie farmacologiche possono essere utili per controllare gli episodi di menometrorragia e ancora, se necessario, per combattere il dolore pelvico. Quindi, la terapia medica può essere mirata a ottenere la ridu-

TABELLA I. — *Principali studi sull'utilizzo prechirurgico degli agonisti e degli antagonisti del GnRH nella fibromatosi uterina.*

Agonisti del GnRH	Antagonisti del GnRH
Crow <i>et al.</i> <sup>9</sup>	Felberbaum <i>et al.</i> <sup>23</sup>
Kawamura <i>et al.</i> <sup>10</sup>	Felberbaum <i>et al.</i> <sup>24</sup>
Mizutani <i>et al.</i> <sup>11</sup>	Gonzalez-Barcena <i>et al.</i> <sup>25</sup>
Vu <i>et al.</i> <sup>12</sup>	
Di Lieto <i>et al.</i> <sup>13</sup>	
Di Lieto <i>et al.</i> <sup>14</sup>	
Filicori <i>et al.</i> <sup>15</sup>	
Maheux <i>et al.</i> <sup>16</sup>	
Friedman <i>et al.</i> <sup>17</sup>	
Friedman <i>et al.</i> <sup>18</sup>	
Schlaff <i>et al.</i> <sup>19</sup>	
Healy <i>et al.</i> <sup>20</sup>	
Perl <i>et al.</i> <sup>21</sup>	
Coddington <i>et al.</i> <sup>22</sup>	
Kettel <i>et al.</i> <sup>26</sup>	

zione prechirurgica del volume dei fibromi uterini.

Le categorie di farmaci disponibili sono molteplici, ma l'efficacia maggiore è stata ottenuta con l'uso degli analoghi agonisti e antagonisti del GnRH<sup>9-26</sup> (Tabella I).

Gli agonisti del GnRH (GnRH-a) determinano un ipogonadismo temporaneo e reversibile attraverso la down-regulation dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Si instaura, pertanto, uno stato di pseudo-menopausa farmacologica reversibile con conseguente amenorrea e riduzione di volume dell'utero e dei fibromi. Questi effetti non sono permanenti: dopo la sospensione della terapia, infatti, l'utero e i fibromi riprendono il loro accrescimento con ricomparsa della sintomatologia meno-metrorragica<sup>9</sup>. D'altra parte, tale terapia non può essere protratta per un periodo molto lungo, a causa dei possibili effetti collaterali di tipo climaterico (vampate di calore, alterazioni del metabolismo lipidico, effetto favorente l'osteoporosi) dovuti alla condizione di privazione estrogenica. Per questi motivi la terapia con GnRH-a viene impiegata come strategia prechirurgica o in epoca perimenopausale. In vista di un intervento chirurgico, tale terapia ha l'intento di favorire una riduzione di volume dei fibromi e/o dell'utero per agevolare l'operazione, ridurre il sanguinamento intraoperatorio e migliorare le condizioni cliniche generali della

paziente; in epoca perimenopausale, lo scopo è controllare la menometrorragia in attesa della cessazione spontanea delle mestruazioni<sup>9</sup>. Attualmente, la terapia prechirurgica con GnRH-a viene consigliata in donne con valori di Hb inferiore a 10,5 g/dl e/o con volume uterino superiore a quello di un utero alla 18° settimana di gestazione. I GnRH-a vengono solitamente somministrati per via intramuscolare o sottocutanea ogni 28 giorni per 4-6 mesi; esistono anche delle formulazioni depot, a rilascio controllato, che contengono una quantità di farmaco pari a 3 dosi (3 mesi) della formulazione standard.

Gli antagonisti del GnRH sono utilizzati in via sperimentale nel trattamento prechirurgico dei miomi uterini solo in alcuni Paesi in cui ne è approvato l'uso (non in Italia). Questi farmaci determinano down-regulation e desensibilizzazione del recettore ipofisario attraverso un blocco recettoriale competitivo che determina la soppressione della secrezione delle gonadotropine. Gli antagonisti del GnRH agiscono molto più velocemente degli analoghi e producono un'immediata inibizione dell'asse ormonale ipofisi-ovaio senza determinare, contrariamente agli analoghi, una stimolazione iniziale della produzione di ormoni sessuali (cosiddetto effetto "flare-up") con conseguente esacerbazione della condizione patologica di base.

### Agonisti del GnRH

I GnRH-a sono disponibili in tutto il mondo e vengono impiegati con successo nel trattamento di numerose condizioni patologiche ormono-dipendenti<sup>9</sup>. Ne esistono diverse forme di cui quella oggi più utilizzata nella terapia medica della fibromiomas uterina, agonisti superattivi, è costituita da molecole con attività biologica e farmacologica sovrapponibile al GnRH naturale, ma più marcata. La somministrazione continua e ad alte dosi di GnRH-a inibisce la secrezione di gonadotropine grazie a un meccanismo recettoriale di down-regulation: l'esposizione cronica a tali farmaci induce una graduale perdita di recettori ipofisari per il GnRH<sup>27</sup>

con conseguente diminuzione del release gonadotropinico e comparsa di uno stato di ipogonadismo per caduta dei livelli circolanti di steroidi sessuali <sup>28</sup>.

A tutt'oggi esistono teorie contrastanti circa il meccanismo d'azione dei GnRH-a nella riduzione di volume dell'utero e dei miomi. Alcuni Autori <sup>29</sup> hanno proposto un'involuzione postmenopausale accelerata basata sulla degenerazione, sulla necrosi e sulla retrazione nodulare ialina delle zone più voluminose dei miomi. In altri studi è stato ipotizzato un decremento del volume o del numero delle cellule leiomiomatose ovvero una riduzione della matrice extracellulare <sup>30</sup>; ancora, sono stati descritti un aumento della morte cellulare per apoptosi <sup>10</sup>, una riduzione della proliferazione cellulare <sup>11</sup> e un incremento dei fenomeni di ialinizzazione <sup>12</sup>. Alcuni Autori hanno ipotizzato che quest'ultimo aspetto possa essere dovuto a un ridotto supporto vascolare determinato direttamente o conseguente allo stato ipoestrogenico indotto dal trattamento <sup>31</sup>. Ancora, altri Autori non hanno riscontrato differenze istologiche significative tra leiomiomi trattati e non trattati <sup>32, 33</sup>.

Gli effetti degli steroidi ovarici sui leiomiomi uterini sono mediati, almeno in parte, dall'attività autocrina e paracrina di fattori di crescita (*growth factors*, GFs) prodotti localmente dalle cellule muscolari lisce dei miomi e dei vasi sanguigni e dai fibroblasti. Il platelet-derived growth factor (PDGF) è stato identificato come il principale fattore di crescita coinvolto nella risposta mitogenica dei leiomiomi alla stimolazione estrogenica *in vitro* <sup>13</sup>. Questi dati sono stati confermati *in vivo* dimostrando una relazione tra l'espressione immunostochimica del PDGF nei leiomiomi e la variazione del volume uterino osservata dopo somministrazione di GnRH-a <sup>14</sup>. Recentemente è stato dimostrato che la terapia con GnRH-a determina una riduzione della sintesi di vascular endothelial growth factor (VEGF), basic-fibroblast growth factor (b-FGF) e PDGF, fattori di crescita angiogenetici, nelle cellule leiomiomatose <sup>14</sup>.

L'impiego degli analoghi del GnRH nel trattamento della fibromiomas uterina risale al 1982, quando Filicori utilizzò, ottenendo ri-

sultati soddisfacenti, tale terapia in una paziente di 25 anni con un leiomioma associato a menometrorragia intrattabile e anemia sideropenica; dopo circa 15 giorni di trattamento si instaurò l'amenorrea, l'Hb aumentò da 7,4 a 12,8 g/dl e il volume del fibroma diminuì da 151 cc a 34 cc <sup>15</sup>. Molti altri Autori hanno successivamente sperimentato questa terapia riportando risultati analoghi, con riduzione del volume dell'utero e dei fibromi in misura variabile dal 60 al 100% <sup>16, 34-37</sup>. Le dimensioni dei miomi si riducono entro le prime 8-10 settimane di trattamento e, generalmente, la riduzione massima è raggiunta entro la 12<sup>a</sup> settimana <sup>17-20</sup>. L'effetto dei GnRH-a è, comunque, transitorio perché, sospesa la sua somministrazione, prontamente si ritorna ai livelli di estradiolo fisiologici con conseguente aumento del volume dell'utero e dei fibromi <sup>21, 22, 38</sup>. L'involuzione indotta dal trattamento è molto più rapida di quella che si verifica spontaneamente con la menopausa fisiologica, presumibilmente per la diversa velocità con cui si instaura la condizione di ipoestrogenismo.

In caso di patologie ormono-dipendenti, sono emersi ulteriori meccanismi attraverso i quali i GnRH-a provocano la loro regressione. I GnRH-a, esplicando direttamente la loro azione a livello cellulare, determinano un'evidente riduzione dei recettori per i fattori di crescita nei leiomiomi uterini <sup>39</sup>, nei focolai endometriosisi <sup>40</sup> e nelle cellule dell'unità anatomo-funzionale duttulo-alveolare della mammella <sup>41-43</sup>. Sono stati evidenziati recettori per il GnRH nel tessuto leiomiomatoso, suggerendo anche un'azione diretta dei GnRH-a in tali formazioni <sup>39</sup>.

L'età della paziente rientra tra i fattori che sembrano condizionare la risposta al trattamento: nelle donne di età inferiore ai 35 anni, infatti, la risposta è più rapida e intensa <sup>40</sup>. Al contrario, il volume iniziale dei leiomiomi e la via di somministrazione del farmaco non appaiono condizionare gli esiti del trattamento.

In alcuni casi l'impiego degli analoghi non ha successo: si tratta di tumori costituiti pressoché totalmente da tessuto fibroso o di fibromi calcifici, che, per la loro costituzione tissutale, sono insensibili alle influenze ormonali e, quindi, scarsamente responsivi al-

la terapia medica<sup>16</sup>. La durata della terapia con GnRH-a è, in media, di 3-6 mesi, con una riduzione del volume uterino del 30-50%<sup>44, 45</sup>. Un crescente numero di studi riporta un'influenza positiva sull'outcome chirurgico come la semplificazione delle procedure chirurgiche e la diminuzione dei tempi dell'intervento e della relativa perdita ematica<sup>45, 46</sup>.

Lo stato di menopausa iatrogena provocato dai GnRH-a è caratterizzato da una completa reversibilità. Dopo la sospensione del trattamento, infatti, l'ipofisi anteriore riprende la sua funzione perché viene ristabilita, a livello ipofisario, la normale popolazione di recettori per il GnRH<sup>47</sup>. Allo stesso modo, al termine della terapia il volume dell'utero e dei fibromi ritorna rapidamente ai valori di partenza. Per tale motivo, nelle donne in età fertile, la terapia dei fibromi uterini con GnRH-a è da considerarsi valida come trattamento prechirurgico. Il trattamento prechirurgico dei miomi uterini con GnRH-a offre alcuni vantaggi attribuibili alla riduzione della loro vascolarizzazione (normalizzazione dei parametri ematologici, riduzione della menometrorragia, del sanguinamento intra-operatorio, delle trasfusioni e dei potenziali rischi delle stesse e possibilità di eseguire delle autotrasfusioni) e a quella del volume dell'utero e dei fibromi (aumento del numero di interventi conservativi, aumento degli interventi per via laparoscopica, intervento tecnicamente più agevole, riduzione del trauma tissutale, possibilità di approccio secondo Pfannenstiel, riduzione delle dimensioni delle incisioni uterine e, di conseguenza, della zona di cicatrizzazione uterina con possibilità di approccio per via vaginale). Gli svantaggi associati all'uso dei GnRH-a sono la lunga durata del periodo di trattamento e la frequente comparsa di sintomi menopausali (cefalea, flushes, variazioni dell'umore e, in alcuni casi, anche una riduzione della densità ossea) che possono temporaneamente perdurare anche alla sospensione del trattamento.

### Antagonisti del GnRH

Il trattamento prechirurgico dei leiomiomi uterini con GnRH antagonisti consente una ri-

duzione del volume dell'utero e dei leiomiomi con conseguente riduzione del sanguinamento intraoperatorio e semplificazione dell'intervento chirurgico.

I GnRH antagonisti esplicano il loro effetto legando con alta affinità i recettori ipofisari del GnRH e competendo con il GnRH endogeno<sup>48</sup>. Essendo privi di attività intrinseca, questi composti non determinano l'effetto "flare-up" presente, invece, dopo somministrazione dei GnRH-a<sup>49</sup>. Attualmente i GnRH antagonisti sono usati clinicamente soprattutto nella prevenzione del picco di LH prematuro nei protocolli di iperstimolazione ovarica (*controlled ovarian hyperstimulation*, COH) per la riproduzione assistita. Il cetrorelix e il ganirelix sono commercialmente disponibili per il COH in alcuni Paesi europei e negli USA, ma non in Italia. L'abarelix è stato, invece, approvato negli USA dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento del carcinoma della prostata avanzato<sup>23, 50</sup>.

Il ganirelix è disponibile come preparazione sottocutanea (s.c.) da 0,25 mg con emivita di 20 h; il cetrorelix, invece, è disponibile come preparazione s.c. da 0,25 mg e come preparazione depot, a rilascio controllato, da 3 mg s.c. con emivita di 16 h. Entrambi determinano una rapido effetto soppressivo sulla ghiandola ipofisaria.

È stato dimostrato che il trattamento prechirurgico con il ganirelix determina un sostanziale riduzione del volume dei leiomiomi (25-40%) entro solo 3 settimane<sup>24</sup> dall'inizio della terapia. La riduzione di volume ottenuta con il ganirelix è sovrapponibile a quella che si verifica utilizzando sia altri tipi di antagonisti del GnRH<sup>25, 51</sup> che i GnRH-a. Tuttavia, in caso di antagonisti del GnRH, l'intervallo di tempo entro il quale si ottiene la riduzione del volume uterino e dei leiomiomi è molto più breve. Tale risultato è ascrivibile al meccanismo d'azione di questa classe di farmaci che determinano un'immediata soppressione dei livelli circolanti dell'LH e dell'FSH endogeni e, di conseguenza, una più rapida riduzione dei livelli circolanti di E<sub>2</sub><sup>52, 53</sup>. Gli agonisti del GnRH, invece, inducono inizialmente un "flare-up" dei livelli di gonadotropine e stimolano la produzione di

estrogeni, condizione che è sfavorevole nelle pazienti con leiomiomi. Sono necessarie circa 3 settimane di trattamento prima che si stabilisca una completa down-regulation. Diversamente, gli antagonisti sopprimono immediatamente l'LH e l'FSH in maniera dose-dipendente; inoltre, tale effetto è rapidamente invertito alla sospensione del trattamento. Questo implica una certa maneggevolezza degli antagonisti del GnRH, per cui si può regolare il livello di inibizione in base all'obiettivo terapeutico, probabilmente riducendo l'incidenza dei sintomi da deprivazione estrogenica<sup>26</sup>.

I primi dati sull'uso degli antagonisti del GnRH per il trattamento dei leiomiomi uterini<sup>54</sup> sono relativi al centrorelax, antagonista del GnRH di seconda generazione somministrato s.c. al dosaggio di 50 µg/kg/die per 3 mesi in 7 pazienti con fibromi uterini sintomatici. I GnRH antagonisti sono ipoteticamente più vantaggiosi per il trattamento dei fibromi uterini rispetto agli agonisti.

Il profilo farmacologico del cetorelix e del ganirelix è simile; entrambi i farmaci sopprimono il rilascio di gonadotropine dopo 4-8 h dalla somministrazione. La preparazione depot è preferibile, ma l'unica attualmente in commercio è quella dell'abarelix, il cui utilizzo è stato approvato solamente per il trattamento del carcinoma prostatico.

Nell'ambito del trattamento della fibromiomas uterina, dal confronto tra il gruppo trattato con GnRH-a e quello trattato con GnRH antagonisti, emerge che con questi ultimi si ottiene riduzione della durata del trattamento (3 settimane *vs* 3-6 mesi). Da ciò derivano due principali vantaggi: da una parte, l'intervento chirurgico può essere programmato più precocemente, riducendo, quindi, al minimo lo stress psicologico dell'attesa, e, dall'altra, l'incidenza degli effetti collaterali è minimizzata rispetto all'uso dei GnRH-a.

Gli effetti collaterali più frequentemente osservati in corso di terapia con antagonisti del GnRH sono i flushing e la cefalea che tendono a manifestarsi dalla terza settimana di trattamento e cioè dopo aver già ottenuto il massimo della riduzione del volume uterino e dei leiomiomi. Tra gli svantaggi del trattamento con gli antagonisti del GnRH vi è la

necessità di iniezioni giornaliere. Pertanto, sarebbe preferibile utilizzare le formulazioni a lunga durata o quelle depot, da somministrare con cadenza settimanale o bisettimanale.

### Conclusioni

Dall'analisi dei dati attualmente presenti in letteratura emerge che sia gli agonisti che gli antagonisti del GnRH possono efficacemente essere utilizzati per il trattamento prechirurgico dei leiomiomi. L'impiego degli antagonisti del GnRH consente di indurre una più rapida riduzione del volume uterino con una minore incidenza di effetti collaterali. Nuovi studi sono necessari per confermare i pochi risultati fino ad oggi pubblicati sul trattamento della fibromiomas uterina con antagonisti del GnRH, per esplorare ulteriormente i meccanismi d'azione di tali farmaci e, non ultimo, per valutare la possibilità di ridurre i dosaggi da impiegare. Attualmente, la mancata autorizzazione all'impiego degli antagonisti del GnRH nel trattamento della fibromiomas uterina pone, nel nostro Paese, un limite alla ricerca in tale direzione.

### Riassunto

I fibromi uterini rappresentano le più comuni neoplasie benigne in ambito ginecologico. La loro crescita è stimolata dagli steroidi ovarici; essi, infatti, diminuiscono di volume in menopausa e negli stati pseudo-menopausali indotti dalle terapie con gli analoghi o gli antagonisti del gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Tale riduzione di volume permette un approccio chirurgico meno invasivo e può ridurre la perdita ematica durante l'intervento. Quindi i GnRH agonisti e antagonisti vengono usati nel trattamento prechirurgico dei fibromiomi uterini. Questa review analizza gli effetti delle terapie con agonisti e antagonisti del GnRH. I GnRH agonisti determinano una down-regulation del recettore per il GnRH, mentre i GnRH antagonisti competono con il GnRH endogeno per il sito di legame ipofisario. A causa della scarsa o nulla attività intrinseca, i GnRH antagonisti non presentano il caratteristico flare-up iniziale, osservato durante il trattamento con GnRH agonisti. Perciò, i GnRH antagonisti sopprimono rapidamente il rilascio delle gonadotropine entro 4-8 h, mentre i GnRH agonisti mostrano i loro effetti clinici dopo 2 o 3 set-

timane di trattamento. L'attività dei GnRH antagonisti è dose-dipendente, perciò è possibile aggiustare la dose per ottenere livelli di inibizione desiderati. Il trattamento con GnRH agonisti è solitamente una terapia a breve termine (3-6 mesi) a causa degli effetti collaterali simil-climaterici. Anche gli effetti clinici dei GnRH antagonisti possono essere ottenuti con una terapia a breve termine. Gli effetti collaterali di questi includono flushes e cefalea. Dopo la sospensione di entrambi i farmaci, i leiomiomi tendono rapidamente a ritornare alle loro dimensioni iniziali, mentre gli effetti collaterali scompaiono. Ulteriori studi sono necessari per stabilire l'utilizzo dei GnRH antagonisti nella terapia dei leiomiomi uterini, ma in Italia ciò non è possibile perché il loro uso non è approvato. Parole chiave: Fibromiomi uterini - Medicina della riproduzione - Analoghi del GnRH - GnRH-agonisti - GnRH-antagonisti.

### Bibliografia

- Wallach EE. Myomectomy. In: Thompson JD, Rock JA, editors. *The Linde's Operative Gynaecology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 1992. p. 647-62.
- Kjerulf K, Guzinky G, Langenberg P, Stolley P, Moye N, Kazadjian V. Hysterectomy and race. *Obstet Gynaecol* 1999;82:757-64.
- Kawaguchi K, Fuji S, Konishi I, Iwai T, Nanbu Y, Nonogaki H *et al*. Immunohistochemical analysis of oestrogen receptors, progesterone receptors and Ki 67 in leiomyoma and myometrium during the menstrual cycle and pregnancy. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1991;419:309-15.
- Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:78-85.
- Vollenhoven BJ, Pearce P, Herington AC, Healy DL. Steroid receptor binding and messenger RNA expression in fibroids from untreated and gonadotrophin releasing hormone agonist pretreated women. *Clin Endocrinol* 1994;40:537-44.
- Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum Reprod* 1997;12:815-22.
- Zhang L, Rees MC, Bicknell R. The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges. *J Cell Sci* 1995;108:323-31.
- Hunt JE, Wallach EE. Uterine factor in infertility: an overview. *Clin Gynaecol* 1974;17:44-64.
- Crow J, Gardner RL, McSweeney G, Shaw RW. Morphological changes in uterine leiomyomas treated by GnRH agonist Goserelin. *Int J Gynecol Pathol* 1995;14:235-42.
- Kawamura N, Ito F, Ichimura T, Shibata S, Umesaki N, Ogita S. Correlation between shrinkage of uterine leiomyoma treated with buserelin acetate and histopathologic findings of biopsy specimen before treatment. *Fertil Steril* 1997;68:632-6.
- Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K, Terada N. Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;84:1253-5.
- Vu K, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA, Kurman RJ. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor and bcl-2 expression in GnRH-agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol* 1998;29:359-63.
- Di Lieto A, De Rosa G, De Falco M, Iannotti F, Staibano S, Pollio F *et al*. Relationship between platelet-derived growth factor expression in leiomyomas and uterine volume changes after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Hum Pathol* 2002;33:220-4.
- Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, Mansueto G, Salvatore G, Somma P *et al*. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. *J Soc Gynecol Invest* 2005;12:123-8.
- Filicori M, Hall DA, Loughlin JS, Rivier J, Vale W, Crowley WF *et al*. A conservative approach to the management of uterine leiomyoma: pituitary desensitization by a luteinizing hormone-releasing hormone analogue. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:726-7.
- Maheux R, Guilloteau C, Lemay A, Bastide A, Fazekas AT. Regression of leiomyomata uteri following hypooestrogenism induced by repetitive LHRH agonist treatment: preliminary report. *Fertil Steril* 1984;42:644-6.
- Friedman AJ, Harrison-Atlas D, Barbieri RL, Benacerraf B, Gleason RE, Schiff I. A randomized, placebo-controlled, double blind study evaluating the efficacy of leuprolide acetate depot in the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1989;51:251-6.
- Friedman AJ, Hoffman DI, Comite F, Browneller RW, Miller JD. Treatment of leiomyomata uteri with leuprolide acetate depot: a double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Obstet Gynecol* 1991;77:720-5.
- Schlaff WD, Zerhouni EA, Huth JA, Chen J, Damewood MD, Rock JA. A placebo-controlled trial of a depot gonadotropin releasing hormone analogue (leuprolide) in the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 1989;74:856-62.
- Healy DL, Lawson SR, Abbott M, Baird DT, Fraser HM. Toward removing uterine fibroids without surgery: subcutaneous infusion of a luteinizing hormone releasing agonist commencing in the luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:619-25.
- Perl V, Marquez J, Schally AV, Comaru-Schally AM, Leal G, Zacharias S *et al*. Treatment of leiomyomata uteri with D-Trp6-luteinizing hormone-releasing hormone. *Fertil Steril* 1987;48:383-9.
- Coddington CC, Collins RL, Shawker TH, Anderson R, Loriaux DL, Winkel CA. Long-acting gonadotropin releasing hormone analog used to treat uteri. *Fertil Steril* 1986;45:624-9.
- Felberbaum RE, Germer U, Ludwig M, Reithmuller-Winzen H, Heises S, Buttge I *et al*. Treatment of uterine fibroids with a slow-release formulation of the gonadotropin releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Hum Reprod* 1998;13:1660-8.
- Felberbaum RE, Kupker W, Krapp M, Gehl B, Ludwig M, Diedrich K. Preoperative reduction of uterine fibroids in only 16 days by administration of gonadotropin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix). *Reprod Biomed Online* 2001;3:14-8.
- Gonzalez-Barcena D, Alvarez RB, Ochoa EP, Cornejo IC, Comaru-Shally AM, Shally AV *et al*. Treatment of uterine leiomyomas with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Hum Reprod* 1997;12:2028-35.

26. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Rivier J, Vale W, Yen SS. Rapid regression of uterine leiomyomas in response to daily administration of gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* 1993;60:642-6.
27. Vichery BM. Pharmacology of LH-RH antagonists. In: Furr BJA, Wakeling AE, editors. *Pharmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action*. London: Bailliere Tindall; 1987. p. 385-92.
28. Badger TM, Loughlin TS, Naddaff PG. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-desensitized rat pituitary: luteinizing hormone responsiveness to LHRH *in vitro*. *Endocrinology* 1983;112:793-9.
29. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981;2:186-209.
30. Deligdisch L, Hirschmann S, Altchek A. Pathologic changes in gonadotropin releasing hormone agonist analogue treated uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1997;67: 837-41.
31. Reinsch RC, Murphy AA, Morales AJ, Yen SS. The effects of RU486 and leuprolide acetate on uterine artery blood flow in the fibroid uterus: a prospective, randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1623-7.
32. De Leo V, La Marca A, Morgante G. Short-term treatment of uterine fibromyomas with danazol. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47:258-62.
33. Sreenan JJ, Prayson RA, Biscotti CV, Thornton MH, Easley KA, Hart WR. Histopathologic findings in 107 uterine leiomyomas treated with leuprolide acetate compared with 126 controls. *Am J Surg Pathol* 1996;20:427-32.
34. Maheux R, Guilloteau C, Lemay A, Bastide A, Fazekas AT. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist and uterine leiomyomata: a pilot study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:1034-8.
35. Friedman AG. Gn-RH agonist therapy for uterine leiomyomata. In: Barbieri RL, Friedman AG, editors. *Gonadotropin releasing hormone analogs: applications in gynecology*. New York: Elsevier; 1991. p. 39-61.
36. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Efficacy of pre-operative gonadotropin hormone releasing analogues for women with uterine fibroids undergoing hysterectomy or myomectomy: a systematic review. *BJOG* 2002;109:1097-108.
37. Friedman AJ, Barbieri RL, Benacerraf BR, Schiff I. Treatment of leiomyomata with intranasal or subcutaneous leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1987;48:560-4.
38. Lumsden MA, West CP, Hawkins RA, Bramley TA, Rungay L, Baird DT. The binding of steroids to myometrium and leiomyomata (fibroids) in women treated with the gonadotropin-releasing hormone agonist Zoladex (ICI 118630). *J Endocrinol* 1989;121:389-96.
39. Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, Staibano S, Campanile M, Pontillo M *et al*. Influence of goserelin depot therapy on epidermal growth factor receptor expression in pelvic endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 1997;11:17-20.
40. Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, Campanile M, Miranda V, Pontillo M *et al*. Hormonal therapies and growth factors in the mammary gland. *Proceedings of Second International Capri conference on Neuroendocrine and Peripheral Disorders of Female Reproductive System: Pathophysiology and Therapies*; 1992. May 22-26; Capri, Italy.
41. Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, Campanile M, Pontillo M, Cimmino E *et al*. Hormonal therapies and EGF-R expression in the human mammary gland. *Breast Dis* 1995;8:259-68.
42. Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, Gallo F, Pontillo M, Micalef R *et al*. EGFEGF-R system and benign breast disease during and following the treatment of gynaecological pathologies with an analogue of LH-RH. *Clin Exp Obst Gyn* 1996;23:220-8.
43. Friedman AJ, Rein MS, Harrison-Atlas D, Garfield JM, Doubilet PM. A randomized, placebo-controlled, double-blind study evaluating leuprolide acetate depot treatment before myomectomy. *Fertil Steril* 1989;52:728-33.
44. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;(2):CD000547.
45. Ginsburg ES, Benson CB, Garfield JM, Gleason RE, Friedman AJ. The effect of operative technique and uterine size on blood loss during myomectomy: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 1993;60:956-62.
46. Frasen HM, Sandow J. Suppression of follicular maturation by infusion of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist starting during the late luteal phase in the stump-tailed macaque monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:579-84.
47. Rivier J. Novel antagonists of GnRH-a compendium of their physicochemical properties, activities, relative potencies and efficacy in humans. In: Lunenfeld B, Insler V, editors. *GnRH analogues - the state of the art*. London: The Parthenon Publishing Group; 1993. p. 13-6.
48. Wong SL, Lau DT, Baughman SA, Menchaca D, Garnik M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of abarelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, after subcutaneous continuous infusion in patients with prostate cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:304-11.
49. Garnick MB, Campion M. Abarelix Depot, a GnRH antagonist, vs LHRH superagonists in prostate cancer: differential effects on follicle-stimulating hormone. *Abarelix Depot study group. Mol Urol* 2000;4:275-7.
50. Flierman PA, Oberyè JJ, Van Der Hulst VP, de Blok S. Rapid reduction of leiomyoma volume during treatment with the GnRH antagonist ganirelix. *BJOG* 2005;112:638-42.
51. Oberyè JJ, Mannaerts BM, Huisman JA., Timmer CJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran). Part II: Dose-proportionality and gonadotropin suppression after multiple doses of ganirelix in healthy female volunteers. *Fertil Steril* 1999;72:1006-12.
52. Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, Niebch G *et al*. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod* 1998;13:2392-8.
53. Nagaraja NV, Pechstein B, Erb K, Klipping C, Hermann R, Locher M *et al*. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of cetrorelix, an LH-RH antagonist, after subcutaneous administration in healthy premenopausal women. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:617-25.
54. Oberyè J, Mannaerts B, Huisman J, Timmer C. Local tolerance, pharmacokinetics and dynamics of ganirelix (Orgalutran) administration by Med-jector compared to conventional needle injections. *Hum Reprod* 2000;15:245-9.



## Uterine dehiscence in term pregnant patients with one previous cesarean delivery: Growth factor immunoexpression and collagen content in the scarred lower uterine segment

Fabrizio Pollio, MD,<sup>a</sup> Stefania Staibano, MD,<sup>b</sup> Massimo Mascolo, MD,<sup>b</sup>  
Gaetano Salvatore, MD,<sup>b</sup> Francesco Persico, MD,<sup>c</sup> Marianna De Falco, MD,<sup>a</sup>  
Andrea Di Lieto, MD<sup>a,d,\*</sup>

Departments of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine,<sup>a</sup> Biomorphological and Functional Science,<sup>b</sup> and General Surgery, Geriatrics, Oncology and Advanced Technologies,<sup>c</sup> University “Federico II” of Naples, Naples, Italy<sup>d</sup>

Received for publication March 14, 2005; revised June 16, 2005; accepted July 12, 2005

### KEY WORDS

Uterine dehiscence  
Uterine scar  
Lower uterine segment  
Wound healing  
Growth factor

**Objective:** This study aimed at investigating the relationship between the occurrence of uterine dehiscence in term pregnant scarred uteri and the presence of altered biochemical behavior of the scarring process.

**Study design:** Collagen content and the expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and transforming growth factor- $\beta$ 3, connective tissue growth factor, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in myometrium of lower uterine segment were assessed in 19 otherwise healthy term patients with one previous cesarean delivery who were not in labor. We were searching for differences between patients who showed uterine dehiscence (9 cases) and patients who showed a normal-appearing scarred lower uterine segment (10 cases). We also evaluated all these features in lower uterine segment from unscarred uteri of 10 otherwise healthy patients who were not in labor.

**Results:** In the case of uterine dehiscence, the scarred lower uterine segment showed a higher collagen content, a reduction of pan transforming growth factor- $\beta$  expression because of a marked decrease or absence of transforming growth factor- $\beta$ 3, a reduction of connective tissue growth factor, an increase in basic fibroblast growth factor and a slight enhancement in vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression.

**Conclusion:** These findings contribute to meliorate our knowledge about uterine scar healing and allow us to hypothesize that uterine dehiscence of a scarred uterus may be related to altered biochemical behavior of the scarring process.

© 2006 Mosby, Inc. All rights reserved.

\* Reprint requests: Andrea Di Lieto, MD, Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine, University “Federico II” of Naples, via S Pansini 5, 80131 Naples, Italy.  
E-mail: dilieto@unina.it

"Once a cesarean always a cesarean": when Cragin<sup>1</sup> made this famous statement in the far 1916, probably he could not imagine the dramatic increase in the rate of cesarean deliveries (CDs) recorded in the last 20 years. Today, the primary cause of CDs is the repeat CD as a consequence of the rare, but higher, possibility of uterine rupture in a CD-scarred uterus.<sup>2-4</sup> Therefore, although any effort to decrease the rate of this operative mode of delivery must regard the elective repeat CDs, we cannot dismiss that uterine rupture of scarred uteri is a major risk of maternal morbidity and neonatal death.<sup>2,4</sup> On the basis of a large number of publications, recent reviews analyzed the safety of vaginal birth after CD (VBAC) and confirmed the relatively low risk of uterine rupture in these cases.<sup>4-6</sup> However, the widespread concern over this obstetric hazard still makes physicians and patients uneasy about attempting trials of labor in women who have had a previous CD.

Wound healing is a complex process, which includes inflammation, angiogenesis, new tissue formation, and tissue remodeling and which finally leads to an at least partial reconstruction of the wounded area.<sup>7</sup> In this cascade of events, evidence revealed a pivotal role of growth factors, step-by-step released from the serum of injured blood vessels and by degranulating platelets, neutrophils, monocytes, lymphocytes, fibroblasts and tissue specific cells.<sup>8</sup> The involvement of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and its isoforms TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3, connective tissue growth factor (CTGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in the scarring process has been demonstrated.<sup>8-10</sup> A recent review summarized several studies that showed altered growth factor expression in various in vitro and in vivo pathologic scar conditions, such as nonhealing ulcers or hypertrophic scar tissues.<sup>8</sup> Collagen deposition, which is a main step in the scarring process, is under growth factor control also.<sup>8,10</sup>

Today, there are still very few data about pathologic features of CD scars, both in normal and in pathologic conditions.<sup>11,12</sup> Macroscopically, daily clinical practice allows us to appreciate a broad spectrum of lower uterine segment (LUS) thickness in laboring or in nonlaboring patients at the time of a repeat CD. According to scarred LUS appearance categories that were proposed by Cheung et al<sup>13</sup> (modified from those of Michaels et al<sup>14</sup> and Fukuda et al<sup>15</sup>), LUS can range from normal-appearing LUS (practically indistinguishable from an unscarred one) to paper-thin LUS (a thinned LUS but not thin enough to visualize the uterine contents). Sometimes, scarred LUS is interrupted, which results in uterine dehiscence (subperitoneal separation of the uterine scar, with chorioamniotic membrane visible through the peritoneum of the LUS) or, rarely and most often during a trial of VBAC rather

than in nonlaboring term pregnant patients, results in uterine rupture (complete separation of the uterine scar, regardless of length, that gives a communication between the uterine and peritoneal cavities).<sup>15,16</sup>

In this study, we evaluated collagen content and TGF- $\beta$ , - $\beta$ 1, - $\beta$ 3, CTGF, b-FGF, VEGF, PDGF, and TNF- $\alpha$  expression in myometrial smooth muscle cells of scarred LUS from 19 otherwise healthy nonlaboring term patients with one previous CD as we sought differences between patients with uterine dehiscence (9 cases) and patients with a normal-appearing LUS (10 cases). We also evaluated all these features in LUS from unscarred uteri of 10 otherwise healthy nonlaboring term patients. Therefore, in favor of future clinical aims too, we considered the existence of differences in biologic behavior of the scarring process to explain the variable clinical phenotype of LUS in a pregnancy after a CD.

## Material and methods

### Specimens

Myometrium specimens of LUS that were analyzed in this study were collected during repeat elective CDs from scarred uteri of nonlaboring singleton term otherwise healthy patients from January 2003 to April 2005 (in our Department, we still do not recommend a trial of labor after a CD but support women when they make that choice). All these women had a single previous transverse lower segment CD that had been performed by surgeons of our Department in the last 5 years and at least 1 year before the present intervention. In all cases, at the time of the first CD, the uterine incisions were repaired with resorbable polyglactic acid sutures (Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ) by single-layer closure with continuous interlocking sutures through the myometrium followed by closure of the visceral peritoneum with continuous sutures. According to Cheung et al<sup>13</sup> categories, we recruited 9 women with uterine dehiscence (group A) and compared all the evaluated features with specimens obtained from 10 women with a normal-appearing scarred LUS (group B). In total, we evaluated 1210 patients who underwent elective repeat CD for previous CD. We observed an incidence of uterine dehiscence of approximately 0.7%. Myometrium specimens of LUS were also collected during CD from 10 nonlaboring singleton term otherwise healthy pregnant women with unscarred uteri (control group) who underwent CD for fetal indications. Another selection criterion for the inclusion in our study was the absence of uterine contractility that was confirmed by cardiotocographic trace that was performed 2 hours at the most before surgery. All evaluated samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. Patient clinical features are given in Table I. Each patient gave informed consent to perform a small biopsy (<5 mm diameter) of

LUS from hysterotomy borderlines at the time of the CD and authorized the use of the surgical samples to scientific aims by signing a written consent at the time of admission.

### Collagen evaluation (red Sirius staining)

We used a histochemical method (red-Sirius staining) to assess the content of collagen fibers in the LUS from the examined patients. Sections that were 4- $\mu$ m thick, dewaxed, and rehydrated were stained with the red Sirius/fast green method in the following manner: (1) staining with a saturated aqueous solution of picric acid that contained 0.01% fast green FCF (Gurr-BDH Chemicals Ltd, Poole, UK) at room temperature away from the light; (2) staining with a saturated aqueous solution of picric acid that contained 0.01% Sirius red F3B (Gurr-BDH Chemicals Ltd) and 0.04% fast green at room temperature away from the light; (3) dehydration, diaphanization, and mounting with a synthetic medium. Sirius red and fast green stain collagen fibers red and stain non-collagen fibers bright green. The non-collagen fiber population consisted of elastic and reticulin fibers. A semiquantitative evaluation of histochemical staining was performed; the overall percent of red-stained fibers was scored in the following manner (for each sample in 10 fields, at magnification  $\times 400$ ): + = <10%; ++ = 10% to 40%; +++ = >40%. In all the cases, the specimens were examined, and the staining was graded without previous knowledge of the clinical data of the patients.

### Immunohistochemical evaluation

Immunohistochemical staining was performed on 5- $\mu$ m thick serial sections from formalin-fixed, paraffin-embedded samples of LUS. Pretreatment of sections with a heat-induced antigen retrieval technique, with incubation in a 650-W microwave oven (3 sequential steps of 4 minutes each in citrate buffer [pH 6.0] 10 mmol/L) was performed. Sections were then incubated for 20 minutes at room temperature with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for quenching the endogenous peroxidases and with nonimmune mouse serum (1:20; Dakopatts, Hamburg, Germany) diluted in phosphate-buffered saline solution bovine serum albumin (1%) for 25 minutes to prevent nonspecific immunostaining. After 3 washings with TRIS-saline buffer, immunostaining was performed with the following antibodies: anti-panTGF (lyophilized monoclonal antibody, clone TGF $\beta$ 17; Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK; 1:100 dilution); anti TGF- $\beta$ 1 (polyclonal antibody, sc-146; Santa Cruz Biochemistry, Santa Cruz, CA; 1:100); anti TGF- $\beta$ 3 (polyclonal antibody, sc-82; Santa Cruz Biochemistry; 1:100); anti-CTGF (polyclonal antibody, sc-14939; Santa Cruz Biochemistry; 1:100); anti-bFGF (polyclonal antibody, sc-7911; Santa Cruz Biochemistry;

**Table I** Clinical features of study patients

Patient	Patient		Weeks		Previous CD indication
	age (y)	Parity of (n)	gestation	CD (n)	
1*	35	0	39	1	Elective repeat CD
2*	33	0	39	1	Elective repeat CD
3*	31	0	39	1	Elective repeat CD
4*	32	0	39	1	Elective repeat CD
5*	39	0	39	1	Elective repeat CD
6*	37	0	39	1	Elective repeat CD
7*	32	1	39	1	Elective repeat CD
8*	28	0	39	1	Elective repeat CD
9*	33	1	39	1	Elective repeat CD
10 <sup>†</sup>	36	0	39	1	Elective repeat CD
11 <sup>†</sup>	37	1	39	1	Elective repeat CD
12 <sup>†</sup>	30	0	39	1	Elective repeat CD
13 <sup>†</sup>	29	0	39	1	Elective repeat CD
14 <sup>†</sup>	31	0	39	1	Elective repeat CD
15 <sup>†</sup>	33	1	39	1	Elective repeat CD
16 <sup>†</sup>	27	0	39	1	Elective repeat CD
17 <sup>†</sup>	38	0	39	1	Elective repeat CD
18 <sup>†</sup>	35	0	39	1	Elective repeat CD
19 <sup>†</sup>	29	0	39	1	Elective repeat CD
20 <sup>†</sup>	33	0	39	None	Breech presentation
21 <sup>†</sup>	37	0	39	None	Fetal congenital heart disease
22 <sup>†</sup>	29	0	40	None	Cephalopelvic disproportion
23 <sup>†</sup>	32	1	39	None	Shoulder presentation
24 <sup>†</sup>	35	0	40	None	Shoulder presentation
25 <sup>†</sup>	23	0	39	None	Breech presentation
26 <sup>†</sup>	31	0	39	None	Breech presentation
27 <sup>†</sup>	37	0	39	None	Breech presentation
28 <sup>†</sup>	26	1	41	None	Cephalopelvic disproportion
29 <sup>†</sup>	34	0	40	None	Cephalopelvic disproportion

\* Scarred uterus (for one previous CD) with LUS dehiscence.

<sup>†</sup> Scarred uterus (for one previous CD) with normal-appearing LUS.

<sup>‡</sup> Unscarred uterus.

1:100); anti-VEGF (polyclonal antibody, sc-152; Santa Cruz Biochemistry; 1:100); anti-PDGF (polyclonal antibody, sc-128; Santa Cruz Biochemistry; 1:100); anti TNF- $\alpha$  (polyclonal antibody, sc-1350; Santa Cruz Biochemistry; 1:100). Incubation was carried out overnight at 4°C in a moist chamber. Immunodetection was performed with sequential 20-minute incubations with biotinylated link-antibodies and peroxidase-labeled streptavidin (LSAB-HRP; Dako, Milan, Italy). As a substrate chromogen solution, 3,3 diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA) with

**Table II** Histochemical score for collagen fibers\* and immunohistochemical<sup>†</sup> score for pan-TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 3, CTGF, bFGF, VEGF, PDGF and TNF- $\alpha$  in groups A, B, and C

Patient no.	Collagen								
	fibers	PanTGF- $\beta$	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 3	CTGF	bFGF	VEGF	PDGF	TNF- $\alpha$
Group A: Scarred uteri with LUS dehiscence <sup>‡</sup>									
1	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
2	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
3	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
4	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
5	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
6	++	++	+	0	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
7	++	++	++	0/+	+	+++	++	++	++/+++
8	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
9	++	++	++	0/+	+	+++	++/+++	++/+++	++/+++
Group B: Scarred uteri with normal-appearing LUS <sup>‡</sup>									
10	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+	+/++	+/++	+/++
11	+	++/+++	++/+++	++/+++	+/++	+	+/++	+/++	+/++
12	+	++/+++	+/+++	++/+++	+/++	+	+/++	+/++	+/++
13	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+	+/++	+/++	+/++
14	+	++/+++	++/+++	++/+++	+	+	+	+	+
15	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+	+/++	+/++	+/++
16	+	++/+++	++/+++	++/+++	+/++	+	+/++	+/++	+
17	+	++	+++	++	+/++	+	+/++	+/++	+/++
18	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+	+	+/++	+/++
19	+	++/+++	++/+++	++	+	+	+	+	+
Group C: unscarred uteri									
20	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/-	+/++	+/++	+/++
21	+	++/+++	++/+++	++/+++	++	+/-	+	+	+
22	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/-	+/++	+/++	+/++
23	+	++/+++	++/+++	++/+++	++	+/-	+	+	+
24	+	++/+++	+++	++/+++	++	+	+/++	+/++	+
25	+	++/+++	++/+++	++/+++	++	+/-	+	+	+
26	+	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/-	+/++	+/++	+/++
27	+	++	++/+++	++/+++	++	+/-	+	+	+
28	+	++/+++	++/+++	++/+++	++	+/-	+/++	+/++	+
29	+	+++	++/+++	++/+++	++	+/-	+	+	+

\* Collagen fibers were evaluated with red Sirius/fast green method.

<sup>†</sup> Growth factor immunorexpression was evaluated in LUS myometrial smooth muscle cells.<sup>‡</sup> Scarred uteri for one previous CD.

0.3% hydrogen peroxide was used. After nuclear counterstaining with hematoxylin, sections were mounted with synthetic medium (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany). A semiquantitative evaluation of immunohistochemistry was performed; scoring the overall percent of immunostained cells (for each sample in 10 fields, at  $\times 400$  magnification) was performed in the following manner: 0 = absence of staining; + =  $\leq 10\%$  of positive cells; ++ = 10% to 40% of positive cells; +++ =  $> 40\%$  of positive cells). In all the cases, sections were examined, and immunostaining was graded without previous knowledge of the clinical data of the patients.

### Statistical analysis

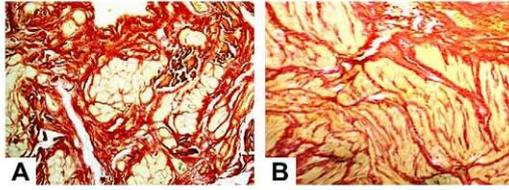
The intraobserver and interobserver agreement (3 expert pathologists) on histochemical and immunohistochemi-

cal staining evaluation was evaluated with K-statistics.<sup>17</sup> A K coefficient  $> 0.75$  denotes excellent reproducibility, whereas a K value  $< 0.4$  denotes marginal/poor reproducibility. A K value between 0.4 and 0.75 denotes moderate reproducibility.

## Results

### Red Sirius staining

The histochemical staining for the detection of collagen fibers in LUS (Table II) showed a score of ++ in all scarred uteri with dehiscence (group A); a score of + was observed in all normal-appearing scarred uteri (group B) and in all unscarred uteri (group C; Figure 1, A and B).



**Figure 1** Red Sirius staining for collagen evaluation. **A**, Note the reduction of muscle fibers, which is associated with an increase of red-Sirius collagen fibers (original magnification,  $\times 250$ ); **B**, collagen content in a patient with unscarred uterus in the control group (original magnification,  $\times 250$ ).

### Immunohistochemical evaluation

All immunohistochemical results are reported in Table II. The immunohistochemical detection of TGF- $\beta$  (pan TGF- $\beta$ ) in LUS myometrial smooth muscle cells with a score of ++/+++ in patients with normal-appearing LUS and in patients with unscarred uteri, each one with a balanced expression of TGF- $\beta_1$  and - $\beta_3$ . In patients with uterine dehiscence, the expression of pan TGF- $\beta$  was lower (++) because of a marked reduction or absence of TGF- $\beta_3$  expression (0/+; Figure 2, *A* and *B*), with a practically unaltered TGF- $\beta_1$  expression (++) . Therefore, the TGF- $\beta_1$ /TGF- $\beta_3$  ratio was found to be higher in patients with uterine dehiscence. The immunohistochemical detection of CTGF in LUS myometrial smooth muscle cells showed a reduced score (+) for all scarred uteri with dehiscence, with respect to normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred ones (Table II). The immunohistochemical detection of bFGF in LUS myometrial smooth muscle cells showed a score of +++ for all scarred uteri, with dehiscence revealing an increased expression of bFGF in this group with respect to normal-appearing LUS scarred uteri (group B) and unscarred ones (group C; Figure 2, *C* and *D*). Then, CTGF and bFGF immunohistochemical detection showed quite similar results between groups B and C. As regards the immunohistochemical detection of VEGF, PDGF, and TNF- $\alpha$  in LUS myometrial smooth muscle cells, the observed score was ++/+++ for all scarred uteri with dehiscence; it ranged from + to ++/+++ in normal-appearing LUS scarred uteri and in unscarred ones (Figure 2, *E* and *F*).

Both in histochemical and immunohistochemical evaluations, the level of agreement expressed by the K coefficient was always  $> 0.7$  (comprised between 0.75 and 0.85, which was good agreement) for intra- and interobserver evaluations.

### Comment

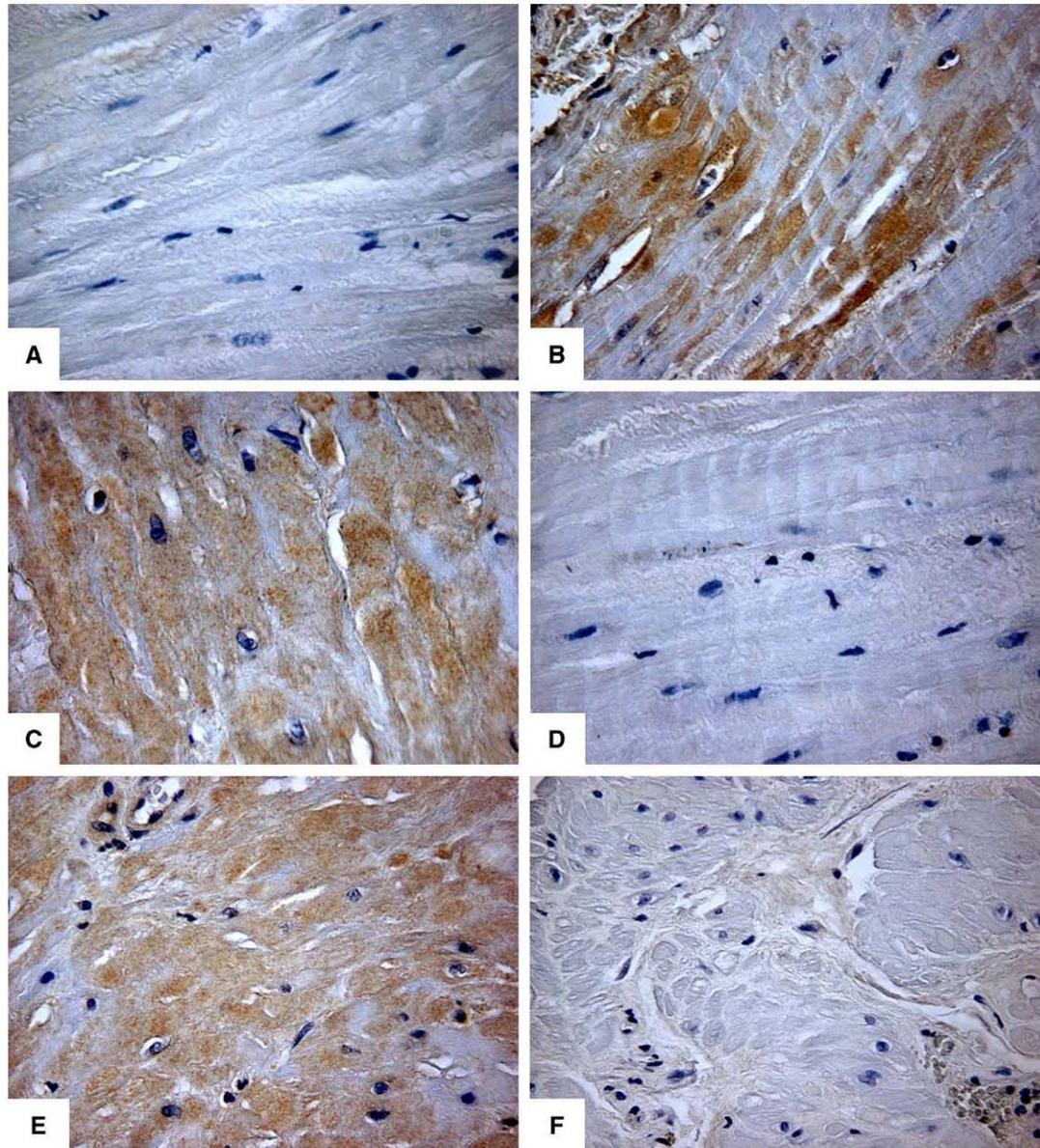
The incidence of uterine dehiscence after a low transverse CD is approximately 1%,<sup>18</sup> whereas the risk of

uterine rupture has been reported recently to globally occur in approximately 1:2900 deliveries, which confirms previous literature.<sup>2</sup> Uterine dehiscence most often occurs at the time of a repeat CD in an asymptomatic manner.<sup>19</sup> Considering that abnormal LUS thinning (paper-thin LUS) and uterine dehiscence represent risk factors of symptomatic uterine rupture, many studies focused on LUS thickness evaluation before a trial of VBAC as part of the treatment of patients with a previous CD.<sup>13-16,19</sup> Uterine rupture most often occurs at the time of a repeat CD,<sup>2-4</sup> whereas in unscarred uteri, it has been reviewed as ranging from 1:17,000 to 1:20,000 deliveries.<sup>2</sup>

VBAC and the safety of this option are discussed widely in the literature.<sup>4-6</sup> A recent review of the Cochrane controlled trials register and MEDLINE (1966-2004) about this concern, even if finding no statistically significant differences between planned elective repeat CD and planned VBAC and demonstrating favorable outcomes in VBAC, underlines the scarce availability of quality information to assist women and their caregivers in this condition.<sup>6</sup> So, at present, the definition of the additional risks that a woman assumes, after a previous CD, when choosing to attempt vaginal delivery rather than have a CD still is not univocal. Further helpful suggestions could arise from a better knowledge of the yet unclear LUS scarring process after a CD.

In this study, we speculated about differences in the biologic behavior of LUS transverse section scarring process at the time of the first CD to explain the variable clinical phenotype of LUS in a subsequent pregnancy. Therefore, we evaluated collagen content and TGF- $\beta$ , - $\beta_1$ , - $\beta_3$ , CTGF, bFGF, VEGF, PDGF, and TNF- $\alpha$  immunorexpression in scarred LUS from term pregnant singleton nonlaboring patients with 1 previous CD, searching for differences between patients with uterine dehiscence and patients with a normal-appearing LUS.

Balanced collagen deposition in the wound area that is under growth factor control also is a key step for good wound healing outcome and tissue function restitution.<sup>8,10</sup> Our results show a higher collagen content in dehiscence LUS of scarred uteri with respect to normal-appearing and unscarred ones. These findings are surely emphasized by the remarkable reduction of LUS smooth muscle fibers content that is observed in uterine dehiscence cases (not reported in the Results section), with subsequently higher collagen fibers/smooth muscle fibers ratio with respect to normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred uteri. We hypothesize that this feature could be crucial to determine the diminished tensile strength of hysterotomy incision that, in some scarred uteri, leads to the interruption of LUS integrity, as observed in case of uterine dehiscence. Moreover, considering that collagen deposition in the wound site depends on growth factors, our findings could be among



**Figure 2** Immunohistochemical staining for TGF- $\beta$ 3, bFGF and TNF- $\alpha$  detection. **A**, TGF- $\beta$ 3 in scarred uterus with dehiscence (original magnification,  $\times 400$ ); **B**, TGF- $\beta$ 3 in a scarred uterus with normal-appearing LUS (original magnification,  $\times 400$ ); **C**, bFGF in scarred uterus with dehiscence (original magnification,  $\times 400$ ); **D**, bFGF in a patient with unscarred uterus in the control group (original magnification,  $\times 400$ ); **E**, TNF- $\alpha$  in scarred uterus with dehiscence (original magnification,  $\times 400$ ); **F**, TNF- $\alpha$  absence in a patient with unscarred uterus in the control group (original magnification,  $\times 400$ ).

the consequences of the impaired growth factor expression that we observed in the case of uterine dehiscence.

The TGF- $\beta$  superfamily encompasses 3 structurally related mammalian TGF- $\beta$  isoforms (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3) that are 60% to 80% homologous and have both distinct and overlapping functions.<sup>8,20</sup> Numerous cells, including myometrial ones, produce TGF- $\beta$  isoforms, and almost all cells respond to the isoforms in different some ways.<sup>8,21</sup> TGF- $\beta$  plays a pivotal role in wound healing by stimulating angiogenesis, fibroblast proliferation, myofibroblast differentiation, matrix deposition, and granulation tissue formation.<sup>8-10,20</sup> TGF- $\beta$ 1 levels appear increased in several animal and human in vitro and in vivo fibrosis conditions; keloid tissues and TGF- $\beta$ 3 seem to down-regulate TGF- $\beta$ 1 production and vice versa. The TGF- $\beta$ 1/- $\beta$ 3 ratio has been shown to be critical to correct wound healing; manipulation of the ratio between TGF- $\beta$  superfamily members, particularly the ratio of TGF- $\beta$ 1 to - $\beta$ 3, reduces scarring and fibrosis.<sup>20</sup> In our study, the immunohistochemical detection of TGF- $\beta$  (pan TGF- $\beta$ ) in LUS from dehiscence uteri showed a lower TGF- $\beta$  expression because of a marked decrease or absence of TGF- $\beta$ 3, with a conserved expression of TGF- $\beta$ 1. Therefore, TGF- $\beta$ 1/- $\beta$ 3 ratio was found to be increased. We could hypothesize that the increased collagen fiber content that we found in LUS from dehiscence scarred uteri could depend, at least in part, on the relatively increased TGF- $\beta$ 1 levels caused by the impaired TGF- $\beta$ 1/- $\beta$ 3 ratio. In this way, our results seem to confirm literature data about the role of TGF- $\beta$ 1 as a fibrosis promoter, the mutual dependence between TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3 activities, and the critical role of TGF- $\beta$ 1/- $\beta$ 3 ratio in correct wound healing.

CTGF has been localized in many different tissues that include normal uterus.<sup>8,12,22</sup> Produced in response to mechanical injury, CTGF shares a chief role in granulation tissue development, in subsequent scar formation, and in wound angiogenesis.<sup>8</sup> In our study, CTGF expression was found to be lower in LUS from dehiscence scarred uteri than in normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred uteri. We speculate that this CTGF impaired expression could be included among the causes of altered LUS scar formation after a CD and of the development of uterine dehiscence, through alteration of both granulation tissue development and angiogenesis process. Absence of the difference in CTGF expression between normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred ones confirms our previously published results.<sup>12</sup>

BFGF, which is well described in myometrium smooth muscle cells,<sup>23</sup> has been widely suggested to be involved in wound healing through its mitogenic and potent angiogenic properties.<sup>8-10</sup> Impaired bFGF levels have been demonstrated in pathologic wound healing conditions.<sup>8</sup> In animal models, bFGF absence is reported to cause

reduced collagen deposition in the wound site and thicker scabs.<sup>24</sup> In our study, we observed higher bFGF expression in LUS from dehiscence scarred uteri with respect to normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred ones. We hypothesize that these higher bFGF levels could be involved, at least in part, in the biochemical scar alterations that lead to uterine dehiscence, such as the clear LUS high collagen content.

VEGF is a major regulator of angiogenesis, which is a chief step in all tissue wound healing.<sup>8,10</sup> In the wound site, after blood clot formation and inflammatory cell invasion, a massive angiogenesis leads to new blood vessel formation, which results in wound connective tissue that is known as granulation tissue. As regards PDGF, it has long been suggested to be a pivotal actor in wound healing.<sup>8-10</sup> PDGF was the first growth factor demonstrated to be chemotactic for cells that are migrating into the wound site, where it enhances fibroblast proliferation and extracellular matrix formation.<sup>8</sup> Another cytokine produced in the wound site is TNF- $\alpha$  that, with its inflammatory and angiogenic properties, has been demonstrated to be able to influence wound healing.<sup>8-10</sup> Several reports described TNF- $\alpha$ , VEGF, and PDGF expression in human myometrial tissues.<sup>12,25-27</sup> In our study, we found a slightly higher expression of TNF- $\alpha$ , VEGF, and PDGF in LUS myometrial smooth muscle cells in the case of uterine dehiscence with respect to normal-appearing LUS scarred uteri and unscarred ones. We suggest that these features could be part of an altered growth factor milieu that has a role in the occurrence of uterine dehiscence.

In conclusion, our findings demonstrated that, in the case of uterine dehiscence, scarred LUS shows biochemical differences with respect to normal-appearing LUS scarred uteri. We hypothesize that uterine dehiscence in term pregnant patients with a previous CD could represent, at least in part, a consequence of an altered scarring process at the time of the first CD. Patients with uterine dehiscence could share a low incisional wound healing power, maybe genetically determined, that could cause a decrease in the CD scar tensile strength that would result in a separation of the uterine scar. We underline that the exact role of this supposed biochemical mechanism in determining uterine dehiscence cannot be established. Moreover, it is difficult to come to clear conclusions because of the existence of a great number of variables that influence hysterotomy incision healing (ie, suture technique and materials that were used; contamination of hysterotomy borderlines by meconium, vernix caseosa, infections). Nevertheless, we believe that the development of these research topics could lead to new therapeutic strategies. The possibility to pharmacologically influence the biochemical and biomechanical properties of healed uterine incisions has been demonstrated already in animal models.<sup>28</sup> Several investigations showed that wound healing can be influenced by

the modification of growth factor levels, and various in vitro and in vivo experimental trials demonstrated an improvement in different pathologic wound healing conditions after growth factor therapies.<sup>8</sup>

Although our study contributes to the exploration of the mechanisms that cause the LUS variable clinical phenotype in a pregnancy after a CD, it has been performed on a restricted number of cases. Therefore, we underline the necessity of further investigations to confirm our results and to examine their possible clinical and therapeutic implications.

### Acknowledgment

We thank Simona De Falco for her assistance in the linguistic revision of the manuscript.

### References

- Cragin EB. Conservatism in obstetrics. *N Y Med J* 1916;104:1-3.
- Ofir K, Sheiner E, Levy A, Kats M, Mazor M. Uterine rupture: risk factors and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1042-6.
- Ofir K, Sheiner E, Levy A, Kats M, Mazor M. Uterine rupture: differences between a scarred and an unscarred uterus. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:425-9.
- Guisse JM, McDonagh MS, Osterweil P, Nygren P, Chan BKS, Helfand M. Systematic review of the incidence and consequences of uterine rupture in women with previous caesarean section. *BMJ* 2004;329:1-7.
- Martel MJ, MacKinnon CJ. Guidelines for vaginal birth after previous caesarean birth. *J Obstet Gynaecol Can* 2004;26:660-83.
- Dodd J, Crowther C. Vaginal birth after caesarean versus elective caesarean for women with a single prior caesarean birth: a systematic review of the literature. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004;44:387-91.
- Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
- Steenfos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1994;28:95-105.
- Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
- Morris H. Surgical pathology of the lower uterine segment caesarean section scar: Is the scar a source of clinical symptoms? *Int J Gynecol Pathol* 1995;14:16-20.
- Di Lieto A, Pollio F, De Falco M, Iannotti F, Mascolo M, Somma P, et al. Collagen content and growth factor immunoeexpression in uterine lower segment of type IA osteogenesis imperfecta: relationship with recurrent uterine rupture in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:594-600.
- Cheung VY, Constantinescu OC, Ahluwalia BS. Sonographic evaluation of the lower uterine segment in patients with previous caesarean delivery. *J Ultrasound Med* 2004;23:1441-7.
- Michaels WH, Thompson HO, Boutt A, Schreiber FR, Michaels SL, Karo J. Ultrasound diagnosis of defects in the scarred lower uterine segment during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1988;71:112-20.
- Fukuda M, Fukuda K, Mochizuki M. Examination of previous caesarean section scars by ultrasound. *Arch Gynecol Obstet* 1988;243:221-4.
- Rozenberg P, Goffinet F, Jean Philippe H, Nisand I. Thickness of the lower uterine segment: its influence in the management of patients with previous caesarean sections. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;87:39-45.
- Landis JR, Loch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1997;33:159-74.
- Chapman SJ, Owen J, Hauth JC. One- versus two-layer closure of a low transverse caesarean: the next pregnancy. *Obstet Gynecol* 1997;89:16-8.
- Gotoh H, Masuzaki H, Yoshida A, Yoshimura S, Miyamura T, Ishimaru T. Predicting incomplete uterine rupture with vaginal sonography during the late second trimester in women with prior caesarean. *Obstet Gynecol* 2000;95:596-600.
- O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor  $\beta$ s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1991;29:63-78.
- Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in uterine fibroids and myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1995;40:120-4.
- Uzumcu M, Al Homsy MF, Ball DK, Coskun S, Jaroudi K, Hollanders JMG, et al. Localization of connective tissue growth factor in human uterine tissue. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1093-8.
- Wu X, Blanck A, Olovsson M, Moller B, Lindblom B. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1 and FGF receptor 2 in uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle, after menopause and GnRH $\alpha$  treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:497-504.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5672-7.
- Taniguchi Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T. Human uterine myometrial smooth muscle cell proliferation and vascular endothelial growth-factor production in response to platelet-derived growth factor. *J Endocrinol* 2001;169:79-86.
- Boehm KD, Daimon M, Gorodeski IG, Sheehan LA, Utian WH, Ilan J. Expression of insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues. *Mol Reprod Dev* 1995;27:93-101.
- Kurachi O, Matsuo H, Samoto T, Maruo T. Tumor necrosis factor-alpha expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J Endocrinol Metab* 2001;86:2275-80.
- Bowers D, McKenzie D, Dutta D, Wheelless CR, Cohen WR. Growth hormone treatment after caesarean delivery in rats increases the strength of the uterine scar. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:614-7.

## Severe secondary postpartum hemorrhage 3 weeks after cesarean section: Alternative etiologies of uterine scar non-union

Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Ugo Buonocore<sup>3</sup>, Gaetano De Rosa<sup>2</sup> and Andrea Di Lieto<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Obstetrical-Gynecologic and Urological Science and Reproductive Medicine, and <sup>2</sup>Biomorphological and Functional Science, University 'Federico II' of Naples, and <sup>3</sup>Division of Histology and Pathology, Hospital 'A. Cardarelli', Naples, Italy

### Abstract

A case of secondary postpartum hemorrhage that occurred 3 weeks after cesarean section requiring total abdominal hysterectomy is reported. The patient's history and pathologic features of the removed uterus did not allow the authors to clearly recognize a previous reported cause of this potentially life-threatening complication. Alternative causes of the non-union of the uterine incision are suggested.

**Keywords:** cesarean section, growth factor, postpartum hemorrhage, uterine dehiscence, wound healing.

### Introduction

Secondary postpartum hemorrhage is an excessive vaginal blood loss or heavy lochial discharge occurring at least 24 h after the end of the third stage of labor and within the following 6 weeks, in sufficient quantity to prompt a review by an obstetrician.<sup>1</sup> Common causes of this potentially life-threatening complication are retention of gestational products, endometritis, primary postpartum hemorrhage, manual placenta removal, and choriocarcinoma. After cesarean section, uterine dehiscence consequent to bacterial infections of the scar, false aneurysm of the uterine pedicle, cephalopelvic disproportion, emergency cesarean section, and placenta previa are common causes and features described in women suffering from this condition.

The authors present a case of secondary postpartum hemorrhage that occurred 3 weeks after cesarean section, and hypothesize alternative causes of the non-union of the uterine incision. To this aim, the pathologic features of the patient's uterus were analyzed and

the expression of several growth factors involved in the uterine scar process was evaluated.<sup>2</sup>

### Case Report

A 31-year-old gravida 2, para 0 with one previous transverse cesarean section underwent elective cesarean during the 39th week of gestation. A healthy male baby, weighing 3050 g, was delivered. The uterus was closed using single-layer continuous interlocking suture with resorbable polyglactic acid sutures, followed by continuous suture of the visceral peritoneum. A uterine suture that was definitely not insufficient was made. Both the intervention and the postoperative period were uneventful. Prophylactic first-generation cephalosporin was administered for 5 days. The patient was discharged after 6 days in a stable condition (hemoglobin: 12.1 g/dL; normal hemochrome and coagulation parameters).

On the 21st day of puerperium, the patient came to hospital with heavy vaginal bleeding and clots.

Received: May 23 2006.

Accepted: August 21 2006.

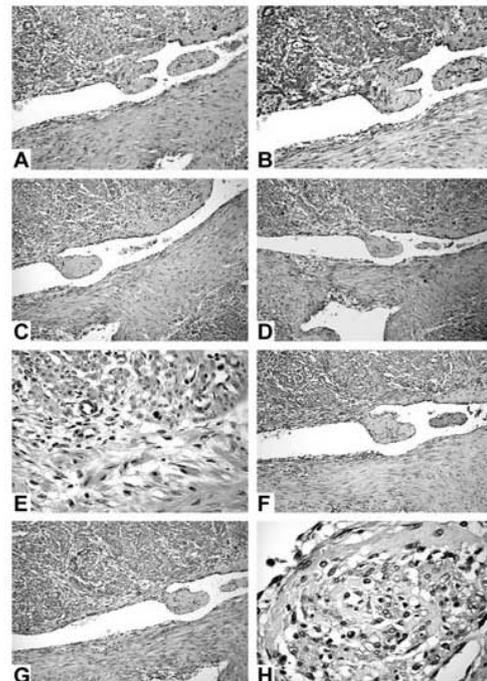
Reprint request to: Professor Andrea Di Lieto, Via Luca Giordano, 120, 80127 Napoli, Italy. Email: dilieto@unina.it  
F. Pollio and A. Di Lieto equally contributed to this work.

Hematological parameters were normal, except for 8.2 g/dL hemoglobin (normal range: 12–16 g/dL) and 13 200/ $\mu$ L white blood cells (normal range: 4800–10 800/ $\mu$ L). Ultrasonography showed a regular uterine involution, suggesting neither retained products of conception nor visible anomalies beyond the recent caesarean scar. The cervix was closed so the evaluation of the uterine scar with a finger was impossible. Clindamycin and gentamicin were administered. The heavy vaginal bleeding persisted and hemoglobin reached 6.9 g/dL. The patient became sweaty and pale looking and showed hypotension (70/50 mmHg) and tachycardia (110 b.p.m.). As the patient's condition deteriorated, about 8 h after admission it was decided to conduct an explorative laparotomy. Three blood units were transfused. A 5-cm defect was observed on the lower uterine segment at the level of the previous hysterorrhaphy. The uterine wound showed a not-healed irregular borderline with profusely bleeding edges. On account of the size of the affected area and with a view to saving the patient's life and avoiding a further worsening of the hemodynamic condition, subtotal hysterectomy was performed. The postoperative recovery was uneventful. The patient was discharged after 5 days. One month later she came for follow up and was healthy.

Histologic routine evaluation was performed on the surgical specimen. It measured 10  $\times$  6  $\times$  4.5 cm. A not-healed scar measuring 5.4 cm was present in the lower uterine segment. The defect borderlines were irregular and approximately 3–4 mm thick. The uterine walls showed almost completely eroded mucous surface with an overlying fibrino-necrotic inflammatory film. Only sporadic endometrial glands were recognized. Focal areas of stromal decidual reaction were noted. HE staining did not show any presence of bacteria. Myometrial postgravidic modifications appeared regular. Sporadic neoangiogenesis foci and focal red blood cells extravasations were observed, mostly in the one-third internal uterine wall portion. Moreover, a diffuse intramural inflammatory infiltrate, mostly characterized by lymphomonocytes (CD45<sup>+</sup>), was noted, sometimes with a perivascular arrangement. The perimetrium showed small hemorrhagic areas and focal zones covered with a thin film of fibrino-inflammatory exudate.

Specimens were conventionally processed for immunohistochemistry to detect basic fibroblast growth factor (b-FGF), connective tissue growth factor (CTGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\beta$

(pan-TGF- $\beta$ ) and its isoforms TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, and vascular endothelial growth factor (VEGF). A semi-quantitative evaluation was performed, scoring the overall percentage of immunostained cells (in 10 fields for each section, at  $\times$ 400 magnification), as follows: '0' = absent staining; '+' =  $\leq$ 10% of positive cells; '++' = >10% to  $\leq$ 40%; '+++ = >40%. These results are summarized in Figure 1. It was noteworthy that



**Figure 1** Immunohistochemical staining. (a) Absent fibroblast growth factor (FGF) expression (labeled streptavidin-biotin method [LSAB]; original magnification,  $\times$ 150); (b) strong connective tissue growth factor (CTGF) expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150); (c) low tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150); (d) focal definite platelet-derived growth factor (PDGF) expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150); (e) strong pan-transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150) (f) non-homogeneous TGF- $\beta$ 1 expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150); (g) moderate to high TGF- $\beta$ 3 expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150); (h) low vascular endothelial growth factor (VEGF) expression (LSAB; original magnification,  $\times$ 150).

around the edges of the uterine defect a clear scar reaction was observed, with absent b-FGF expression and strong CTGF expression.

## Discussion

The quoted incidence of secondary postpartum hemorrhage after cesarean section is 0.1%.<sup>3</sup> In the present case, both the patient's history and the accurate analysis of the removed uterus did not allow us to clearly recognize any previous reported cause of severe secondary postpartum hemorrhage. Particularly, HE staining did not find any presence of bacteria. Although this method is not able to reveal all bacteria, the associated lack of significant amount of granulocytes and the undoubtedly higher incidence of polymicrobe infections lead us to exclude this pathogenetic hypothesis. The finding of a lymphomonocytic inflammatory infiltrate, sometimes with perivascular arrangement, could suggest new hypotheses for the dehiscence of the surgical repair, like a viral infection as well as autoimmune processes.

The authors have previously reported that the dehiscence of a scarred uterus may be related to altered biochemical behavior of the scarring process, characterized by higher collagen content and different expression of several growth factors with respect to non-dehiscent scarred uteri.<sup>2</sup> One may speculate that over- and under-expressions of growth factor genes involved in uterine scarring process could represent patient's specific features, increasing the risk of caesarean scar complications. The authors have previously

reported a case of recurrent uterine rupture in a pregnant woman with a heritable connective tissue disease, Type IA osteogenesis imperfecta, suggesting a relationship with a characteristic altered collagen content and growth factors immunoexpression in the lower uterine segment.<sup>4</sup>

Considering the demonstrated chief role of the analyzed growth factors in controlling collagen deposition in the wound site and the whole scarring process, the authors cannot exclude that the present findings of a clear scar reaction with absent b-FGF expression and strong CTGF expression could represent a picture of an altered biochemical behavior of the scarring process of this patient, causing non-union of the hysterorrhaphy with a consequent secondary postpartum hemorrhage.

## References

1. Hoveyda F, MacKenzie IZ. Secondary postpartum haemorrhage: incidence, morbidity and current management. *BJOG* 2001; **108**: 927-930.
2. Pollio F, Staibano S, Mascolo M *et al.* Uterine dehiscence in term pregnant patients with one previous cesarean section: growth factors immunoexpression and collagen content in the scarred lower uterine segment. *Am J Obstet Gynecol* 2006; **194**: 527-534.
3. Shweni PM, Bishop BB, Hansen JN, Subrayen KT. Severe secondary postpartum haemorrhage after cesarean section. *S Afr Med J* 1987; **72**: 617-619.
4. Di Lieto A, Pollio F, De Falco M *et al.* Collagen content and growth factor immunoexpression in uterine lower segment of type IA osteogenesis imperfecta: relationship with recurrent uterine rupture in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **189**: 594-600.

LA DEISCENZA UTERINA NELLA GRAVIDA A TERMINE  
CON TAGLIO CESAREO PREGRESSO: IMMUNOESPRESSIONE  
DEI GROWTH FACTORS E CONTENUTO DI COLLAGENE  
NELLA CICATRICE DEL SEGMENTO UTERINO INFERIORE

**Fabrizio Pollio**<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>,  
Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Massimo Mascolo<sup>2</sup>,  
Chiara Mignogna<sup>2</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università 'Federico II', Dip. Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e  
Medicina della Riproduzione

<sup>2</sup> Università 'Federico II', Dipartimento Scienze Biomorfologiche e Funzionali

**Introduzione:** Negli ultimi 20 anni il numero dei tagli cesarei in Italia è notevolmente aumentato. Oggi, la prima causa responsabile di tale aumento è il taglio cesareo pregresso, a causa della possibilità, rara ma più alta rispetto all'utero non cesarizzato, di rottura d'utero a livello della pregressa cicatrice sul segmento inferiore durante il travaglio di parto. La guarigione delle ferite è un fenomeno complesso, che coinvolge diversi processi, quali infiammazione, angiogenesi, formazione di nuovo tessuto e rimodellamento. In questa cascata di eventi un ruolo centrale è svolto dai growth factors, quali il TGF- e le isoforme 1 e 3, il CTGF, il bFGF, il PDGF, il VEGF e il TNF-. Alterazioni nell'espressione dei suddetti fattori di crescita sono state osservate in caso di anomalie della cicatrizzazione. Scopo di questo studio è valutare l'esistenza di una eventuale correlazione tra la deiscenza uterina nella gravidanza a termine a livello della pregressa cicatrice sul segmento inferiore e la presenza di alterati processi biochimici nel fenomeno della cicatrizzazione.

**Materiali e Metodi:** Sono state reclutate 19 gravide a termine non in travaglio di parto, sane, con un pregresso taglio cesareo trasversale sul segmento uterino inferiore, effettuato da non più di 5 anni e da non meno di 1 anno. Le pazienti sono state sottoposte a taglio cesareo iterativo. Di queste, 9 pazienti presentavano una deiscenza uterina (gruppo A), mentre 10 mostravano una cicatrice di aspetto normale (gruppo B). Come gruppo di controllo (gruppo C) sono state reclutate 10 gravide a termine non in travaglio di parto, sane, con utero non cesarizzato, sottoposte a taglio cesareo per indicazione fetale. Quindi, sono stati analizzati campioni di miometrio prelevati dal segmento uterino inferiore durante il taglio cesareo, e sono stati valutati il contenuto di collagene e l'espressione immunoistochimica del TGF- e delle isoforme 1 e 3, del CTGF, del bFGF, del PDGF, del VEGF e del TNF-.

**Risultati:** Rispetto agli uteri cesarizzati con cicatrice di aspetto normale, nella deiscenza uterina la cicatrice mostra un più alto contenuto di collagene, una riduzione dell'espressione del TGF-, a causa di una marcata riduzione o assenza della isoforma 3, e del CTGF, un incremento del bFGF ed infine un lieve aumento di VEGF, PDGF e TNF-.

**Conclusioni:** Questi risultati contribuiscono a migliorare la nostra conoscenza circa la guarigione della cicatrice uterina e consentono di ipotizzare che la deiscenza uterina, in una gravida a termine con taglio cesareo pregresso, potrebbe essere legata ad alterazioni del comportamento biochimico nel processo di cicatrizzazione al tempo del primo taglio cesareo.

**IL SEGMENTO UTERINO INFERIORE NEL TAGLIO CESAREO PREGRESSO: CORRELAZIONE TRA DEISCENZA UTERINA, CONTENUTO DI COLLAGENE ED IMMUNOESPRESSIONE DEI FATTORI DI CRESCITA**

*Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Anna Bustello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli “Federico II” – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione

**Scopo:** Il presente studio si propone di valutare l'esistenza di una eventuale correlazione tra la deiscenza uterina, nella gravidanza a termine a livello della pregressa cicatrice sul segmento uterino inferiore, e la presenza di alterati processi biochimici nel processo di cicatrizzazione. In particolare, è stato valutato il contenuto di collagene e l'immuno-espressione di alcuni fattori di crescita, quali TGF-beta e le sue isoforme beta-1 e beta-3, CTGF, bFGF, VEGF, PDGF e TNF-alfa, implicati nel processo di guarigione delle ferite. Infatti, alterazioni nell'espressione dei suddetti fattori di crescita sono state osservate in caso di anomalie della cicatrizzazione.

**Materiali e metodi:** 19 gravide a termine, non in travaglio di parto, sane, con un pregresso taglio cesareo trasversale sul segmento uterino inferiore effettuato da non più di 5 anni e da non meno di 1 anno, sono state sottoposte a taglio cesareo iterativo. Di queste, 9 presentavano una deiscenza uterina, mentre 10 mostravano una cicatrice di aspetto normale. Come gruppo di controllo sono state reclutate 10 gravide a termine non precesarizzate, sottoposte a taglio cesareo per indicazione fetale. Quindi sono stati analizzati campioni di miometrio prelevati dal segmento uterino inferiore durante l'intervento.

**Risultati:** Nella deiscenza uterina, rispetto agli uteri cesarizzati con cicatrice di aspetto normale e al gruppo di controllo, la cicatrice mostra un più alto contenuto di collagene, una riduzione dell'espressione immunoistochimica di TGF-beta, a causa di una marcata riduzione o assenza dell'isoforma beta-3, e di CTGF, un incremento di bFGF ed infine un lieve aumento di VEGF, PDGF e TNF-alfa.

**Conclusioni:** Questi risultati contribuiscono a migliorare le nostre conoscenze sulla guarigione della cicatrice uterina e consentono di ipotizzare che la deiscenza uterina, in una gravida a termine con un pregresso taglio cesareo trasversale sul segmento uterino inferiore, potrebbe essere legata ad alterazioni del comportamento biochimico nel processo di cicatrizzazione al tempo del primo taglio cesareo.

## ► Four years' experience with antepartum cardiotocography using telemedicine

Andrea Di Lieto\*, Marianna De Falco\*, Marta Campanile\*, Rosa Papa<sup>†</sup>, Miklos Torok<sup>‡</sup>, Mariangela Scaramellino\*, Massimo Pontillo\*, Fabrizio Pollio\*, Gabor Spanik<sup>‡</sup>, Paola Schiraldi\* and Gianluca Bibbò<sup>§</sup>

\*Prenatal Care Unit, Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine, University "Federico II" of Naples, Italy; <sup>†</sup>Local Health Unit NA 1, Naples, Italy; <sup>‡</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, National Health Centre, Semmelweis University, Budapest, Hungary; <sup>§</sup>Philips Medical Systems, Naples, Italy

### Summary

We reviewed the first four years of experience with telemonitoring of patients with high-risk pregnancies. Nine peripheral units (eight in Campania, a region of south Italy, and one in Hungary) recorded cardiotocographic traces and transmitted them via modem to an operations centre at the University 'Federico II' in Naples, where the computerized analysis was performed. The medical report was returned to the peripheral unit via fax or email. Four thousand and twenty one traces were recorded: 2674 (67%) from 764 high-risk patients and 1347 (34%) from 499 patients at apparent low risk. The neonatal outcome was good overall. Questionnaires were sent to the operators working at the peripheral units to evaluate the acquisition of specific skills and their level of satisfaction. Sixty-six questionnaires about cardiotocographic trace interpretation were collected. The number of correct answers increased during the study. A total of 33 questionnaires about job satisfaction were collected. The answers showed that the operators gradually overcame their scepticism during the study. A total of 1098 questionnaires were answered by the patients. Their answers showed a moderate level of satisfaction. Telecardiotocography allowed the decentralization of prenatal surveillance.

### Introduction

Cardiotocography is the most common method of monitoring fetal well being, both before and during birth. Practically all pregnant women at high risk undergo electronic fetal monitoring in the last half of pregnancy, at a frequency ranging from daily to weekly.<sup>1,2</sup> The traditional visual interpretation of cardiotocographic traces is subject to high intra- and inter-observer variability.<sup>3,4</sup> Computerized analysis can overcome some of these limitations and it also allows other measurements, such as the short-term variability (STV), which is more specifically related to fetal hypoxia.<sup>5</sup> In comparison with traditional fetal heart rate trace analysis, computerized cardiotocography is

associated with a reduction in the duration of the test and in the number of additional examinations performed for evaluation of fetal well being.<sup>6</sup>

Telemedicine has been used in cardiotocography to avoid the referral of too many pregnant women to clinics or hospitals and to reduce long stays in hospital for high-risk patients. An early description of a long-distance cardiotocographic transmission, in 1983, referred to the use of telemetry applied to cardiotocographic recording.<sup>7</sup> Subsequently, computerized networks for the distance transmission and analysis of cardiotocographic traces have been described.<sup>8</sup>

In Italy, the first system for telecardiotocography, called TOCOMAT, began to be used in the year 2000 at the University 'Federico II' of Naples.<sup>9</sup> The main aim of the project was to extend specialized medical expertise to pregnant women living a long way from properly-equipped health centres who would otherwise require

Accepted 2 December 2005

Correspondence: Professor Andrea Di Lieto, Via Luca Giordano, 120, 80127 Napoli, Italy (Fax: +39 081 746 2954; Email: dilieto@unina.it)

long stays in hospital for fetal monitoring. Data about the first year's operation of the project have been published.<sup>10</sup>

### The telecardiotocography network

The TOCOMAT network connects eight peripheral units located in small hospitals and consulting rooms in Campania, a region in the south of Italy. The network operations centre is located in Naples, the regional capital, at the University 'Federico II'. From 2004, a remote unit located at the Department of Obstetrics and Gynaecology of the Semmelweis University of Budapest (Hungary) has also been working with the operations centre. Peripheral units are equipped with a traditional cardiotocograph able to transmit via modem both fetal heart rate traces and data about patients to the operations centre.<sup>9,10</sup> Data are received there, displayed and stored in a system called OB TraceVue (Philips Medical Systems) which provides a computerized analysis of the traces. Within a few minutes, the computerized trace, together with the analysis and medical reports, are sent back to the peripheral unit by fax or by email.

The aim of the present study was to review the first four years of experience with telemonitoring of patients with high-risk pregnancies. During the first two years, we also accepted traces recorded from low-risk patients, in order to test the system and allow the training of the personnel involved.

## Methods

### Analysis of cardiotocographic traces

For each patient, demographic data and information about pregnancy risk factors were recorded and stored in a database. We also recorded details of the delivery, the birth weight of the newborn, the Apgar score and the need for neonatal intensive care.

Based on the computerized analysis and the ranges provided by the International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO)<sup>11</sup> and the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists,<sup>12</sup> the two doctors working at the operations centre classified the traces as 'reassuring', 'non reassuring' and 'pathological'. In cases of a 'non reassuring' trace, further examination of the fetal condition (i.e. by ultrasonography) and repeating the trace were recommended, while urgent hospitalization was recommended if the traces were pathological.

The results of the computerized analyses were stored in spreadsheet files (Excel, Microsoft). They were grouped together by gestational week, since the 31st

week of gestation for high-risk pregnancies and since the 37th week for apparent low-risk pregnancies. The results included basal heart rate (FHR, beats/min), number of large accelerations/hour, number of small accelerations/hour, STV (ms), long-term variability (LTI), Delta variation (beats/min), interval index and Approximate Entropy (ApEn). Particular importance was given to the ApEn, which is derived from the fetal cardiac frequency using chaos theory.<sup>13</sup> In growth retarded fetuses, ApEn seems to be more predictive of fetal acidosis than STV.<sup>14</sup>

Percentiles and normal curves proposed by Arduini *et al.*<sup>15</sup> were used to analyse the above variables in relation to gestational age. In addition, the system performed a spectral analysis of the traces for the experts working at the operation centre as further indicators of fetal autonomic nervous system activity.<sup>16-19</sup>

### Acquisition of specific skills and satisfaction of operators and patients

To evaluate the acquisition of specific skills and the satisfaction of the operators working at the peripheral units (one doctor at each unit), we asked them to answer two questionnaires. The first one, submitted twice a year, was a test about the interpretation of a cardiotocographic trace. It consisted of five multiple-choice questions, with 1 point for each right answer, 0 for each wrong answer. The second one, submitted once a year, concerned the job satisfaction of the operators. It consisted of five questions, each one with two possible answers, 'yes' and 'no'. A similar questionnaire was also mailed to the monitored patients after delivery, to test their compliance and satisfaction.

## Results

### Telemonitoring activity and analysis of the traces

During the first four years, 499 pregnant women at apparent low risk and 764 at high risk received cardiotocographic monitoring (Table 1). In total, 4190 traces were recorded. One hundred and sixty nine of these traces (4%) were repeated because of technical problems or inadequacy. Excluding them, 2674 (67%) traces were recorded from pregnant women at high risk and 1347 (34%) from patients at apparent low risk, with a total of 4021 good-quality traces. The most common reason for monitoring high-risk patients was pre-term labour, see Figure 1. On average, patients at

**Table 1** Characteristics of the patients and number of recorded traces

	Patients at apparent low risk (n=499)	Patients at high risk (n=764)
Mean age, years (SD)	26 (7)	27 (7)
Mean parity (SD)	0.56 (1.1)	0.65 (1.1)
Number of recorded traces	1423	2767
Number of repeated traces	76	93
Number of traces analysed	1347 (34%)	2674 (67%)

apparent low risk had 2.7 traces each, while patients at high risk had 3.5 traces each.

In the group at apparent low risk, 396 patients (79%) had 'reassuring' traces, 81 patients (16%) had at least one 'non reassuring' trace and 22 patients (4%) had at least one 'pathological' trace. In the group at high risk, 405 patients (53%) had 'reassuring' traces, 269 patients (35%) had at least one 'non reassuring' trace and 90 patients (12%) had at least one 'pathological' trace.

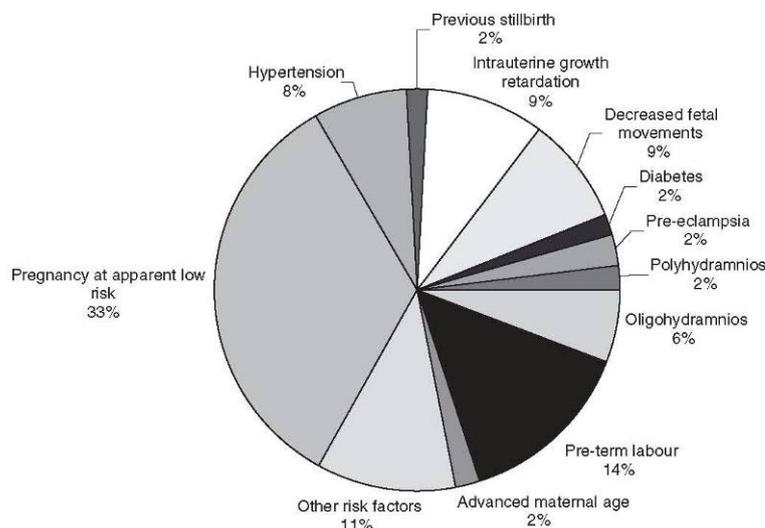
At each week of pregnancy, the mean values from the computerized cardiotocographic analysis were within the normal ranges published by Arduini *et al.*<sup>15</sup> (Table 2). The type of delivery and perinatal outcome are summarized in Table 3. We did not observe any false negative results. A case of intrauterine fetal death at 31 weeks of gestation occurred in the group at high risk. Forty nine percent of patients (32% of apparent low-risk patients and 60% of high-risk patients) underwent caesarean section. Eleven newborns (1 from a patient at

apparent low risk and 10 from patients at high risk) were admitted to neonatal intensive care units, with an overall good outcome.

### Acquisition of specific skills and satisfaction of operators and patients

Sixty-six questionnaires about cardiotocographic trace interpretation were collected (two questionnaires a year from each peripheral unit, and two questionnaires from the Hungarian unit). The number of correct answers increased during the course of the project (Figure 2).

A total of 33 questionnaires about job satisfaction were collected (one a year from each of the eight units located in Campania and one from the Hungarian unit). The number of answers 'yes' to question numbers 1, 2, 4 and 5 and of answers 'no' to question number 3 increased during the course of the project (Table 4). At the beginning, the operators were afraid of losing their professional independence because of their involvement in the project. They also doubted that the trace displayed at the operations centre after transmission would be identical to the trace recorded at the peripheral unit. However, their answers showed that they gradually overcame their scepticism during the course of the project. From the beginning of the project, they had positive opinions about the usefulness of computerized cardiotocography in the management of high-risk pregnancies. Finally, they



**Figure 1** Reasons for telecardiotocographic monitoring

**Table 2** Mean values of cardiotocographic variables at each week of gestation in patients at high risk and at apparent low risk

Week of gestation	Fetal heart rate (beats/min)	Large accelerations (hour)	Small accelerations (hour)	STV (ms)	LTI	Delta variation (beats/min)	Interval index	Approximate entropy
<i>Patients at high risk</i>								
31	142	1.1	3.2	6.7	17.0	14.0	4.7	1.09*
32	145	2.4	5.2	5.7	18.0	12.8	5.2	1.29
33	143	6.8	5.9	5.4	18.3	12.3	6.0	1.25
34	135	12.3	4.6	7.3	16.5	14.0	4.4	1.20
35	135	11.2	4.0	7.6	19.3	14.5	4.0	1.19
36	137	15.2	4.6	6.1	21.6	12.8	5.0	1.25
37	135	14.8	7.5	6.6	18.4	13.1	4.8	1.20
38	136	15.6	5.3	6.8	21.9	12.8	6.2	1.19
39	136	12.2	6.3	6.4	23.9	13.2	6.2	1.17
40	136	10.2	5.7	5.9	24.1	12.2	5.9	1.29
41	128	9.3	4.3	6.1	19.6	11.1	4.2	1.31
42	125	9.9	5.5	5.3	22.2	10.4	4.9	1.31
<i>Patients at apparent low risk</i>								
37	135	17.7	6.9	6.6	18.5	13.1	4.2	1.25
38	136	21.1	8.4	6.8	24.0	13.8	5.4	1.21
39	136	17.8	9.1	6.4	28.2	14.2	6.9	1.22
40	136	10.2	7.7	5.9	26.1	16.2	7.7	1.37
41	138	12.0	6.2	6.1	19.9	11.1	6.0	1.29
42	135	15.2	5.3	5.3	21.2	12.4	4.92	1.35

\*The mean value of approximate entropy at 31 weeks of gestation is not indicated in the percentiles and normality curves reported by Arduini *et al.*<sup>15</sup>

**Table 3** Type of delivery and neonatal outcome

	Patients at apparent low risk (n=499)	Patients at high risk (n=764)
Gestational age at delivery, weeks (SD)	38.8 (2.6)	37.6 (2.5)
Neonatal weight, kg (SD)	3.2 (0.6)	2.9 (0.7)
Mean Apgar score at 1 min (SD)	8.3 (1.4)	7.8 (1.7)
Mean Apgar score at 5 min (SD)	8.8 (0.8)	8.0 (1.3)
Number of newborns admitted to the neonatal intensive care unit	1 (0.2%)	10 (1.3%)
<i>Group with reassuring traces</i>		
Vaginal delivery	396 (79%)	405 (53%)
Elective caesarean section	290 (73%)	246 (61%)
Emergency caesarean section	97 (25%)	132 (33%)
Emergency caesarean section	9 (2%)	27 (7%)
<i>Group with non-reassuring traces</i>		
Vaginal delivery	81 (16%)	269 (35%)
Elective caesarean section	52 (64%)	40 (15%)
Emergency caesarean section	18 (22%)	137 (51%)
Emergency caesarean section	11 (14%)	92 (34%)
<i>Group with pathological traces</i>		
Vaginal delivery	22 (4%)	90 (12%)
Elective caesarean section	0 (0%)	17 (19%)*
Emergency caesarean section	7 (32%)	0 (0%)
Emergency caesarean section	15 (68%)	73 (81%)

\*One endouterine fetal death, 16 preterm newborns with a low birth weight.

expressed an increasing appreciation of the project as a method of continuing education.

A total of 1098 questionnaires was answered by the patients and sent back to the peripheral units. The answers showed a moderate level of satisfaction by the patients who appreciated the organization of the telecardiotocography system and felt reassured by the interaction between their own consultant doctors, the operators working at peripheral units they were referred to and the operations centre (Table 5).

## Discussion

.....

Campania is one of the regions of Italy with a high birth rate. In the last few years, an increasing number of pregnant women, both at high risk and at apparent low risk, have been overcrowding health centres to undergo cardiotocographic monitoring. Since adequately equipped health centres are often located a long way from the patients' homes, pregnant women

who need to undergo intensive cardiotocographic monitoring are forced to travel long distances or to undergo long hospital stays. Moreover, health workers increasingly request the computerized analysis of cardiotocographic traces because, based on the evidence in the literature, it is more accurate and objective than the traditional visual analysis and shows a better correlation with fetal health.<sup>20</sup> In spite of this growing demand, the number of computerized systems for cardiotocographic interpretation available in Campania is very low, due to their high cost and to the need for adequately trained personnel.

During the first four years of use of the TOCOMAT system, 764 high-risk patients underwent computerized cardiotocographic monitoring in their own environment and were hospitalized only when necessary. Admissions were efficiently planned, as a consequence of a continuous interaction between peripheral units and the operations centre. Several patients at apparent low risk were included in the first phase of the project, to facilitate the training of the operators and to test the equipment. In some of these

patients, the cardiotocographic analysis revealed 'non reassuring' or 'pathological' patterns that required further fetal health evaluation or hospitalization.

Both in high-risk and apparent low-risk patients, the neonatal outcome overall was good and the computerized values were mainly normal. An increase in the number of preterm births and of caesarean sections are frequently cited as examples of the risk associated with the widespread adoption of cardiotocographic recording. However, in spite of the substantial number of cases in the present study, mainly high risk patients, we found a caesarean rate of 49%, in comparison to the rate observed in Campania which is 61%.<sup>21</sup>

Our experience confirms that prenatal telemedicine may allow a gradual decentralization of obstetric surveillance, with subsequent improvement in the quality of life for the mothers and the newborn. As demonstrated in a previous study,<sup>22</sup> the computerized cardiotocographic analysis in a telemedicine system increases the efficiency of the service provided to the patients. Such a system allows peripheral units, although located far from the university operations centre and provided with modest resources, to use computerized analysis.

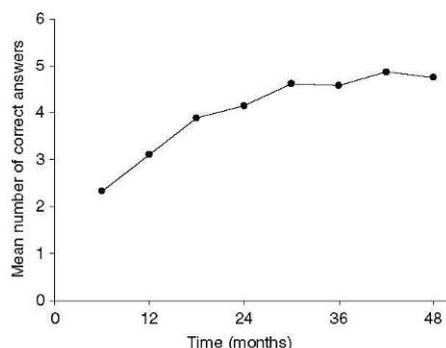


Figure 2 Mean scores of the questionnaire evaluating the acquisition of specific skills

Table 5 Results of the patients' questionnaire (n=1098)

Question	Percentage of 'yes'
1 Did you regularly receive fetal monitoring at the remote unit involved in the telecardiotocography project?	89
2 Was the transfer to the remote unit stressful for you or your family?	7
3 Did you feel reassured by the fact that the trace was also interpreted by the experts and the computerized systems of the university operations centre?	83
4 Did you wait too long for the results of the computerized analysis performed at the operations centre?	18
5 Did your trust in your own doctor diminish as a consequence of your participation in the telecardiotocography project?	11

Table 4 Results of the operators' questionnaire

Question	1st year (n=8)	2nd year (n=8)	3rd year (n=8)	4th year (n=9)
1 Do you think the organization of a telecardiotocography network is useful to improve the management of pregnant women at risk?	50	63	75	89
2 Do you think the computerized interpretation of the traces is really useful to support your clinical decision?	63	63	88	100
3 Do you think you could lose your own professional independence because of your involvement in the telecardiotocography project?	75	63	25	11
4 Do you think the trace displayed at the operations centre is effectively identical to that recorded at the peripheral unit?	25	75	100	100
5 Do you think the interaction with the experts of the operations centre is useful as an experience of continuous distance training?	13	38	63	78

The percentage answering 'yes' is shown.

**Acknowledgements:** Andrea Di Lieto and Marianna De Falco contributed equally to this work.

## References

- 1 Van Geijn HP. Developments in CTG analysis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1996;**10**:185–209
- 2 Di Renzo GC, Copray FJA, O'Herlihy C, Van Geijn HP. Maternal-fetal surveillance within the European community. In: Van Geijn HP, Copray FA, eds. *A Critical Appraisal of Fetal Surveillance*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994;11–15
- 3 Devoe LD. Nonstress testing and contraction stress testing. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;**26**:535–56
- 4 Bernardes J, Costa-Pereira A, Ayres-do-Campos D, Van Geijn HP, Pereira-Leite L. Evaluation of interobserver agreement of cardiotocograms. *Int J Gynecol Obstet* 1997;**57**:33–7
- 5 Anceschi MM, Piazzè JJ, Ruozzi-Berretta A, *et al.* Validity of short term variation (STV) in detection of fetal acidemia. *J Perinat Med* 2003;**31**:231–6
- 6 Bracero LA, Morgan S, Byrne DW. Comparison of visual and computerized interpretation of nonstress test results in a randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 1999;**181**:1254–8
- 7 Dalton KJ, Dawson AJ, Gough NA. Long distance telemetry of fetal heart rate from patients' homes using public telephone network. *Br Med J* 1983;**286**:1545
- 8 Bernardes J, Moura ACF, Marques-de-Sà J, Pereira-Leite L, van Geijn HP. The Porto system. In: Van Geijn HP, Copray FA, eds. *A Critical Appraisal of Fetal Surveillance*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994;315–24
- 9 Di Lieto A, Catalano D, Pontillo M, *et al.* Telecardiotocography in prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2001;**7**:119–20
- 10 Di Lieto A, Giani U, Campanile M, De Falco M, Scaramellino M, Papa R. Prenatal telemedicine: clinical experience with conventional and computerised antepartum telecardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;**103**:114–18
- 11 FIGO. News: guidelines for the use of fetal monitoring. *Int J Gynaecol Obstet* 1987;**25**:159–67
- 12 Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. *The Use of Electronic Fetal Monitoring. Evidence-Based Clinical Guideline Number 8*. London: RCOG Press, 2001. See [http://www.rcog.org.uk/resources/public/pdf/efm\\_guideline\\_final\\_2may2001.pdf](http://www.rcog.org.uk/resources/public/pdf/efm_guideline_final_2may2001.pdf) (last checked 28 September 2005)
- 13 Bozoki Z. Chaos theory and power spectrum analysis in computerized cardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;**71**:163–8
- 14 Weiner Z, Farmakides G, Schulman H, Casale A, Itskovitz-Eldor J. Central and peripheral haemodynamic changes in post-term fetuses: correlation with oligohydramnios and abnormal fetal heart rate pattern. *Br J Obstet Gynecol* 1996;**103**:541–6
- 15 Arduini D, Valensise H. Cardiotocografia computerizzata: utilizzo clinico. [Computerised cardiotocography: clinical application]. In: Arduini D, Valensise H, eds. *Cardiotocografia Clinica. Clinical Cardiotocography*. Roma: CIC Edizioni Internazionali, 2003; 221–33
- 16 Marple L. *Digital Spectral Analysis with Applications*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1987;264–5
- 17 Peters CH, ten Broeke ED, Andriessen P, *et al.* Beat-to-beat detection of fetal heart rate: Doppler ultrasound cardiotocography compared to direct ECG cardiotocography in time and frequency domain. *Physiol Meas* 2004;**25**:585–93
- 18 Kobayashi H, Yoshida A, Kobayashi M, Hamada T, Noguchi Y, Yamada T. A new computerized analysis to precisely evaluate heart rate variability during the nonstress test. *Am J Perinatol* 2003;**20**:77–85
- 19 Van Leeuwen P, Geue D, Lange S, Hatzmann W, Gronemeyer D. Changes in the frequency power spectrum of fetal heart rate in the course of pregnancy. *Prenat Diagn* 2003;**23**:909–16
- 20 Dawes GS, Moulden M, Redman CWG. The advantages of computerized fetal heart rate analysis. *J Perinat Med* 1991;**19**: 39–45
- 21 Arsierì A, Pugliese A, Saporito M, Triassi M. *Rapporto sulla natalità in Campania 2003*. [Report on Births in Campania 2003] Napoli: Campania Region, 2005
- 22 Ippolito A, De Falco M, Triassi M, Di Lieto A. A cost study of prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2003;**9**:288–91



## Antepartum cardiotocography: A study of fetal reactivity in frequency domain

Maria Romano<sup>a</sup>, Marcello Bracale<sup>a,\*</sup>, Mario Cesarelli<sup>a</sup>, Marta Campanile<sup>b</sup>,  
Paolo Bifulco<sup>a</sup>, Marianna De Falco<sup>b</sup>, Mario Sansone<sup>a</sup>, Andrea Di Lieto<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Electronic Engineering & Telecommunications, University of Naples "Federico II", via Claudio 21, 80125 Naples, Italy*

<sup>b</sup>*Department of Obstetric–Gynaecology and Urological science and Reproductive Medicine, "II Polyclinic of Naples", via Pansini 5, 80131 Naples, Italy*

Received 16 December 2004; accepted 20 April 2005

---

### Abstract

Cardiotocography (CTG) is the most widely used diagnostic technique in clinical practice to monitor fetal health. Cardiotocographic recording also permits to assess maturation of the fetal autonomous nervous system (ANS): fetal heart rate (FHR) modifications may reveal ANS' reactions to stimuli. To assess fetal reactivity, physicians evaluate specific clinical CTG parameters, generally, by means of visual inspection, thus depending on observer's expertise, with lack of reproducibility. Still nowadays, there is a very high intra- and inter-observer variation in the assessment of FHR patterns. More objective methods for CTG interpretation are of crucial importance. For adults, frequency analysis of heart rate variability (HRV) is a non-invasive and powerful method to investigate ANS activity. This frequency analysis can also be a valid support for a better knowledge of fetal ANS functional state and reactions. Indeed, fetal HRV is a good indicator of fetal well-being in non-stress conditions. Fetal reactivity is a very important CTG characteristic used to diagnose fetal distress, but its interpretation is still uncertain. The aim of this study is to characterise fetal reactivity proposing new fetal HRV frequency parameters to support a more exhaustive CTG analysis.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Fetal reactivity; Computerised spectral analysis; Cardiotocography; Fetal heart rate variability

---

---

\* Corresponding author. Tel.: +0039 081 593 8522; fax: +0039 081 768 3804.  
E-mail address: bracale@unina.it (M. Bracale).

## 1. Introduction

Cardiotocography is the most widely used indirect diagnostic technique in clinical practice to monitor fetal health during pregnancy and labour [1]. It can be used from the 24th week of gestation to delivery [2]. However, it is generally used from the 35th week in clinical routine. CTG monitoring has been proved to be useful [1], especially in antepartum period; since its introduction in the 1960s, electronic fetal monitoring led to a considerable reduction of perinatal morbidity and mortality. CTG recording provides information about fetal development and well-being, particularly, CTG can assess maturation of the autonomous nervous system (ANS) of the fetus: specific fetal heart rate (FHR) modifications reveal ANS' reactions to stimuli [3].

In general, physicians mainly evaluate the following parameters to assess fetal reactivity: FHR mean value (related to week's gestation), FHR variability, accelerations, decelerations and fetal movements. The efficiency of this method depends on the expertise and training of the observer, but obviously it lacks of objectivity and reproducibility [4]. Moreover, important physiological mechanisms, like thermoregulatory oscillations, maturational changes with advancing gestational age, fetal behavioural states and maternal drugs [5,6] can influence FHR and its variability. Still nowadays, there is a very high intra- and inter-observer variation in the assessment of FHR patterns, which can lead to an incorrect evaluation of fetal status [6–8]. On one hand a falsely diagnosed fetal distress may lead to an unnecessary intervention; on the other hand, an incorrect diagnosis of fetal well-being may deny the necessary care [9]. Thus, more reliable, objective and reproducible methods for CTG interpretation are of crucial importance [8].

CTG signal processing may provide a more accurate assessment of certain parameters and, in turn, of fetal condition. Many software have been developed [9–13] to provide more objective parameters [14] and more reliable assessment criteria. Fetal-status automatic classifiers are generally based on the same parameters adopted by clinicians (accelerations, decelerations, contractions detection, etc.) and process signals in time domain. This approach led to a partial reduction of intra- and inter-observer variation but did not show significant clinical improvements, mainly because the selected set of parameters is not always able to point out particular conditions such as fetal hypoxia or acidemia [15,16]. Therefore, in some computerized systems, quantitative evaluation of other FHR time-domain indexes was introduced, as the short term variability (STV) or beat-to-beat variability, and the long term variability (LTV), reflecting cyclic fluctuations of the FHR baseline [9,16]. However, even by adding these parameters indubitable diagnosis were not achieved.

For adults, heart rate variability (HRV) frequency analysis is a useful, non-invasive and powerful method to investigate ANS activity [17]. Different components of HRV power spectrum reflect, in their reciprocal relationship, changes in the sympathovagal balance both in physiological and pathological conditions [18]. Analogously, also for the fetus, HRV (defined as the fluctuations of the FHR around its baseline), could be a valid support for more objective analyses and for a better knowledge of ANS functional state and reactions [19,20]. Indeed, FHR Variability (FHRV) has been proved to be a good indicator for the evaluation of fetal well-being and reactivity in non-stress conditions.

Fetal reactivity is considered a very important CTG characteristic to diagnose fetal health or distress but its interpretation is still somewhat uncertain.

The aim of this study is to characterise fetal reactivity proposing new FHRV frequency-domain parameters to distinguish between reactive and non-reactive fetuses and therefore support a more exhaustive CTG analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Data collection

Cardiotocographic signals were acquired during clinical routine monitoring both at the “Department of Obstetrical–Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine”, University “Federico II”, Naples, Italy, and at the private hospital “Clinica Villalba del prof. U. Bracale”, Naples, Italy, using HP-M1351A cardiotocographs equipped with an ultrasound Doppler probe to detect FHR signal and a pressure transducer to record uterine contractions (UC signal). The US transducer transmits 998.4 kHz ultrasound bursts with intensity of  $1.5 \text{ mW/cm}^2$  (below security level set at  $0.1 \text{ W/cm}^2$ ) and repetition rate of 3.2 kHz. The recorded FHR signal lies within the range of 50–240 bpm (beats per minute) with a resolution of 0.25 bpm. The UC probe consists of a strain gauge transducer mounted on an abdominal belt and provides a signal in the range of 0–127 mmHg with a resolution of 0.5 mmHg. The cardiotocograph was connected to a laptop PC through a serial (RS232) connection. An interface software, developed by our research group, allows the recording of FHR, UC and patient’s data (name, hospital ID, weeks of gestation, date, time, etc.). Doppler ultrasound devices derive trigger signals from the reflection of sonic waves from the beating fetal heart; fetal movements, maternal movements or muscle contractions may eventually alter the received ultrasonic waves [21]. The HP-135x fetal monitors series, like most of the currently used CTG monitors, use an autocorrelation technique to compare any heart beat Doppler signal with the followings, in order to improve beat-to-beat intervals detection and the reliability of the Doppler method [21].

CTGs were recorded from women between 31st and 41st week amenorrhea, who were in normal course of pregnancy and had taken no drugs; patients laid down in a rest position. At birth, neonatal parameters such Apgar score, new-born weight, kind of delivery (spontaneous or caesarean), eventual maternal pathologies, etc. have been also collected.

CTG signals lasting less than 20 min, intrapartum recordings and excessively noisy signals were excluded from this analysis. At the end, 95 CTG were accepted for this analysis.

### 2.2. Pre-processing

As FHR is a discrete-time signal (a sample is available only when a new heart beat occurs) while the UC is a continuous-time signal, in order to assure the necessary synchronization, cardiotocographs sample both signals at a fixed rate, then using a zero-order interpolation for FHR values. This is a suitable solution for FHR time-domain analyses (e.g. baseline extraction, accelerations, decelerations detection, etc.), but not for frequency analyses because such interpolation modifies the FHR spectrum [22]. In order to reduce the spectrum alterations due to zero-order interpolation, a pre-processing algorithm for the recovery of the true FHR series from raw CTG data was developed [23].

Another problem, related to the Doppler technique, is that the recorded FHR signals often result noisy and may contain artefacts, caused by possible degradation, or even loss, of the Doppler signal mainly due to relative motion between US probe and fetal heart, maternal movements and other causes (as a matter of fact, CTG devices are used to show clearly the signal strength (quality), which can result optimal, acceptable or insufficient, the latter corresponding to signal loss). The pre-processing algorithm segments each recorded signal into a number of reliable continuous tracts (i.e. where the signal quality level is not insufficient); furthermore, an opportune procedure removes possible

cardiac arrhythmia and then replaces unreliable signal tracts lasting less than 4 s using linearly interpolated values; finally, FHR processed data are uniformly re-sampled at 4 Hz and aligned with UC (within 0.25 s).

### 2.3. FHR signals analysis

Once the FHR signals were pre-processed, expert clinicians were asked to divide the selected CTG signals into two categories: reactive fetuses (RF) and non-reactive fetuses (NRF). A fetus is defined as reactive if two or more accelerations (an increase in the FHR of 15 bpm during at least 15 s) are identified within a 20 mins CTG [8,24]. The fetus is declared non-reactive if the variability of the FHR is very tiny (less than 5 bpm) even in presence of fetal movements (detected as short, small spikes superimposed onto UC signal) (Fig. 1). The clinicians classified 75 CTGs as corresponding to RF and 20 to NRF.

According to literature [11,25], the FHRV frequency analysis was carried out in each signal using only a 3 min segment (we decided not to use longer portions in order to collect a large number of comparable segments [26]). Our target was to emphasise eventual specific spectrum characteristics only related to steady physiological mechanisms and not to particular external or internal stimuli. Therefore, the 3 min segment was selected in absence of large FHR alterations (e.g. accelerations and/or decelerations) and other phenomena such as uterine contractions and/or fetal movements; segments were always corresponding to periods of low FHR variability. We assessed the frequency characteristics of fetal reactivity by evaluating FHRV power spectrum density. FHRV, as for adult, shows a lobed spectrum, each component corresponds to a FHR control elicited by the two branches of the ANS (sympathetic and parasympathetic or vagal). It is possible to observe a Very Low Frequency (VLF) component,  $1/f$  shaped, below 0.01 Hz, related to very slow controls mechanisms (thermal and humoral), a predominant Low Frequency (LF) component, around 0.1 Hz, reflecting mainly sympathetic regulation, and a High Frequency (HF)

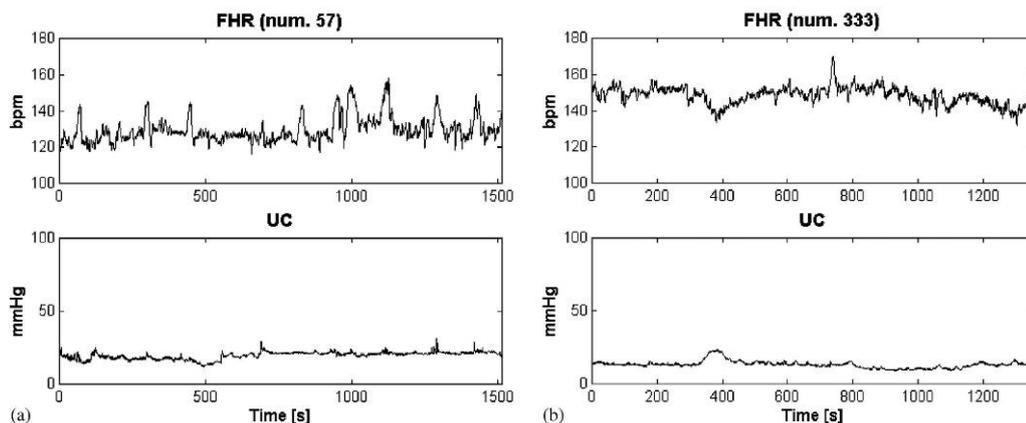


Fig. 1. (a) An example of CTG corresponding to a reactive fetus, (b) an example of CTG corresponding to a non-reactive fetus.

component above 0.4 Hz regarding vagal activity, which seldom appears, involving much less power with respect to LF [7].

Because of the non-stationarity of the FHRV signal, a time-varying frequency analysis by means of Short Time Fourier Transform has been employed. A window length of 128 samples (corresponding to 32 s) was chosen, accordingly to literature [22]. The FHRV was obtained by removing the floating-line (median line of the FHR signal: 0–0.03 Hz), estimated by a smoothing cubic spline. After, the Power Spectral Density (PSD) grand averages relative to the two categories (RF and NRF) were evaluated. For each category, PSD peak values (expressed in  $\text{bpm}^2/\text{Hz}$ ) and their frequency positions were computed in three different frequency ranges: 0–0.2 Hz, 0.2–0.4 Hz, 0.4–0.8 Hz. For each frequency range, the mean power (expressed in  $\text{bpm}^2$ ), with SD of the powers corresponding to the different signals, were also evaluated. To check the separation between the RF and NRF categories, a Student *t*-test was used (level of statistical significance were set at *p* value < 0.05).

### 3. Results

Characteristics of the average PSD of FHRV resulted in strong differences between RF and NRF categories, confirming the usefulness of the frequency analysis as a support in distinguishing fetal reactivity. The amplitude of the average PSD related to RF, its peak value and mean power resulted higher than those related to NRF, for each of the three frequency ranges (Fig. 2). No considerable difference was observed in the frequency peak position (Table 1).

The populations of the average powers of the two categories (RF and NRF), computed in the frequency range 0–0.2 Hz, resulted not in complete separation, but in partial overlap (Fig. 3). However, RF population resulted in significant differences (*t*-test) compared with NRF population.

The average PSD has been computed for each frequency range in each week's gestation in the range 37–40. For each week's gestation, in the frequency range of 0–0.2 Hz, the PSD average corresponding to RF is higher than the PSD average corresponding to NRF. Moreover, the average power shows a slight increase going from 37th to 38th week of gestation and then a slight decrease, both for RF and NRF categories. This result is like findings in the previous literature [7] (Figs. 4–7; Table 2).

### 4. Discussion

Currently, physicians base their diagnosis of fetal condition on visual inspection of CTG recordings, sometimes supported by algorithms that automatically compute specific time-domain parameters. This is insufficient to certainly identify suspect or ambiguous conditions. Frequency analysis of FHRV could be a useful, additional tool. This work presents a study for improving the understanding and the interpretation of cardiotocographic data, with particular interest in fetal reactivity. Sometimes, the fetus is in a healthy status but the CTG does not show, in time-domain, characteristics corresponding to the definition of RF. In these situations, clinicians base their diagnosis almost exclusively on their experience. Therefore, it should be advantageous to have a new tool to support diagnosis in such doubtful cases. Preliminary results are satisfying, because they seem to indicate a certain differentiation between RF and NRF categories in frequency domain. This information could be useful to further support physicians' decisions and to improve the knowledge of fetal condition. However, these results must be confirmed by a more extensive

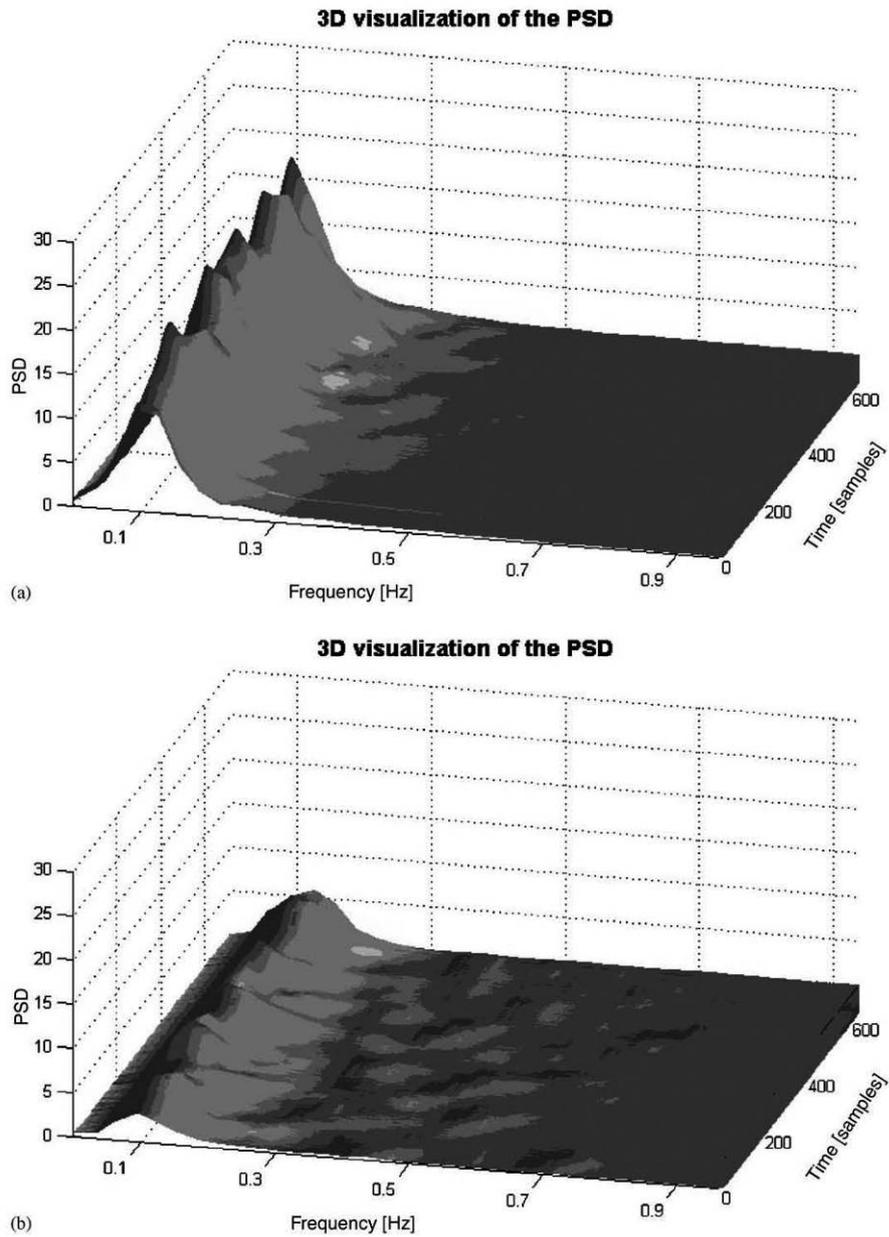


Fig. 2. (a) Average PSD corresponding to reactive fetuses (PSD of RF), (b) average PSD corresponding to non-reactive fetuses (PSD of NRF).

Table 1  
Parameters evaluated in the range 0–0.2 Hz for the two signal subsets

	0–0.2 Hz				
	Maximum amplitude of PSD (bpm <sup>2</sup> /Hz)	Peak frequency (Hz)	Average power (bpm <sup>2</sup> )	SD	Number of segments
RF	17,920	0.125	1.553	1.140	75
NRF	5,780	0.125	0.412	0.177	20

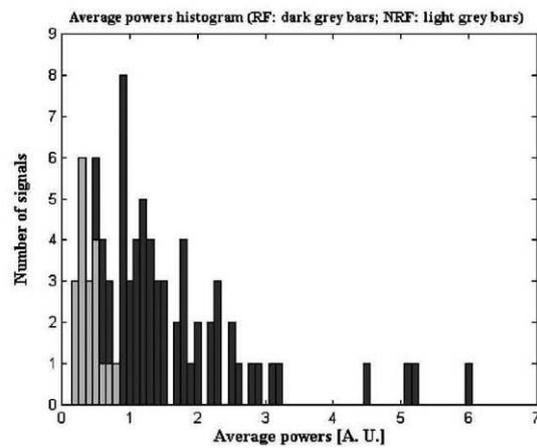


Fig. 3. Histograms of average powers: dark-grey bars correspond to RF, while light-grey bars correspond to NRF.

analysis. Another step will be to determine a possible threshold to separate recordings belonging to the subset of RF from NRF.

## 5. Summary

Cardiotocography is the most widely used pre-natal diagnostic technique in clinical routine. The simultaneous recording of fetal heart rate and uterine contractions provides useful information about fetal well-being during pregnancy and labour. Since its introduction in the 1960s, electronic fetal monitoring led to a considerable reduction of perinatal morbidity and mortality. However, fetal electronic monitoring interpretation still lacks of reproducibility and objectivity. New methods of interpretation and new parameters can further support physicians' decisions. Available computerised analyses of cardiotocograms mainly provide time-domain parameters (e.g. average, variability, accelerations and decelerations of FHR, intensity and frequency of UC, fetal movements, etc.). Beside those methods, study of the variability of fetal heart rate can potentially reveal autonomic nervous system activity of the fetus. In clinical

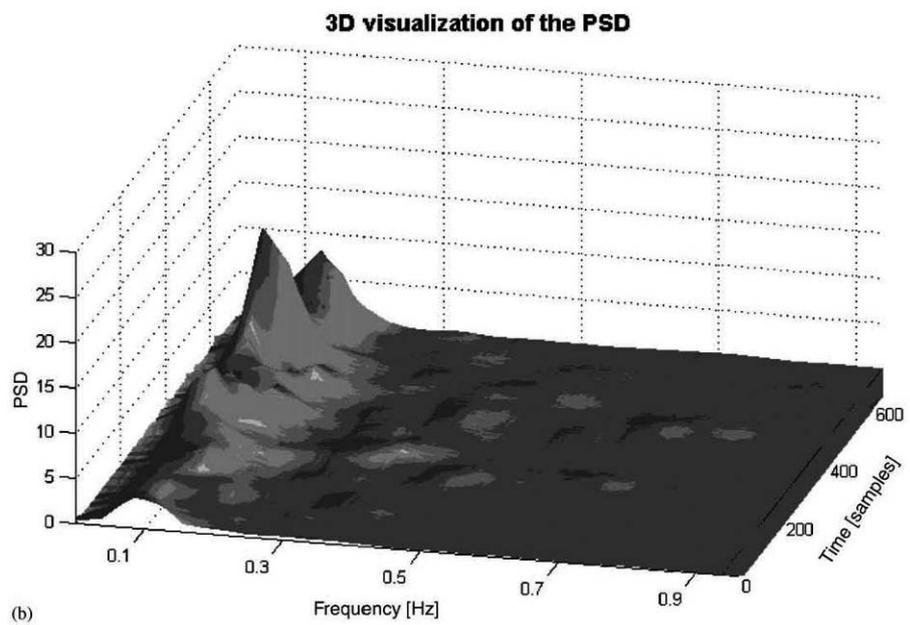
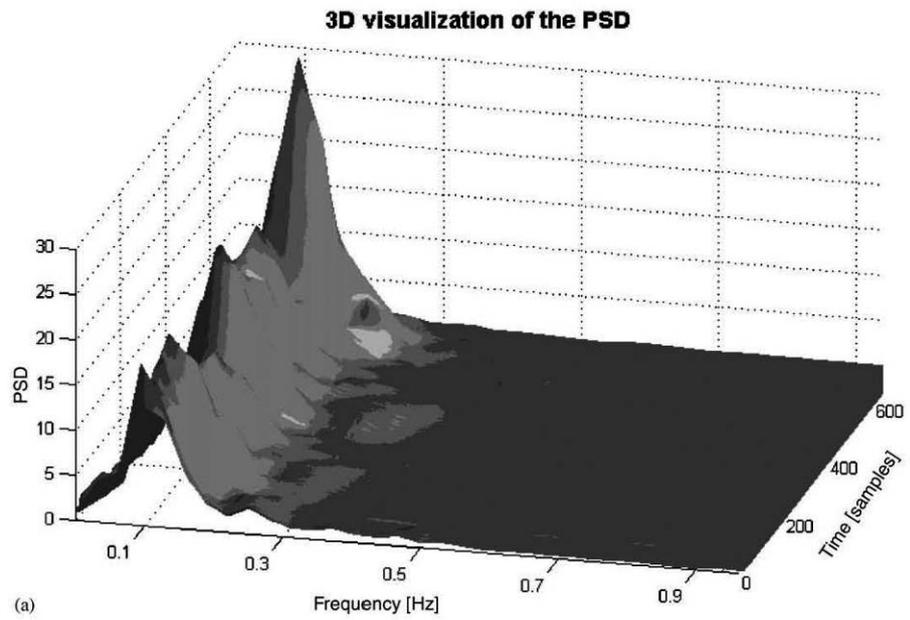


Fig. 4. (a) Average PSD of RF, (b) average PSD of NRF; both corresponding to 37th week's gestation.

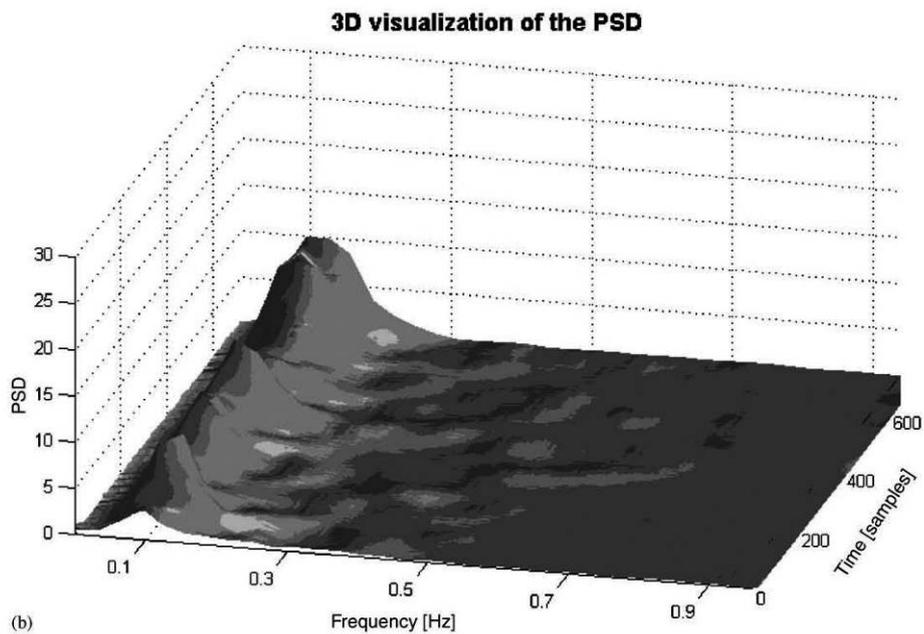
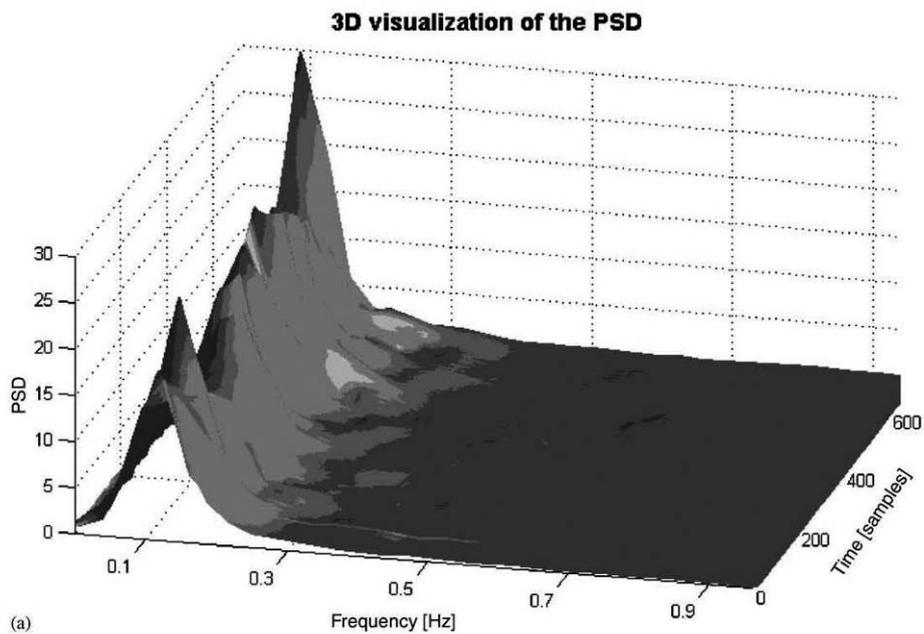


Fig. 5. (a) Average PSD of RF, (b) average PSD of NRF; both corresponding to 38th week's gestation.

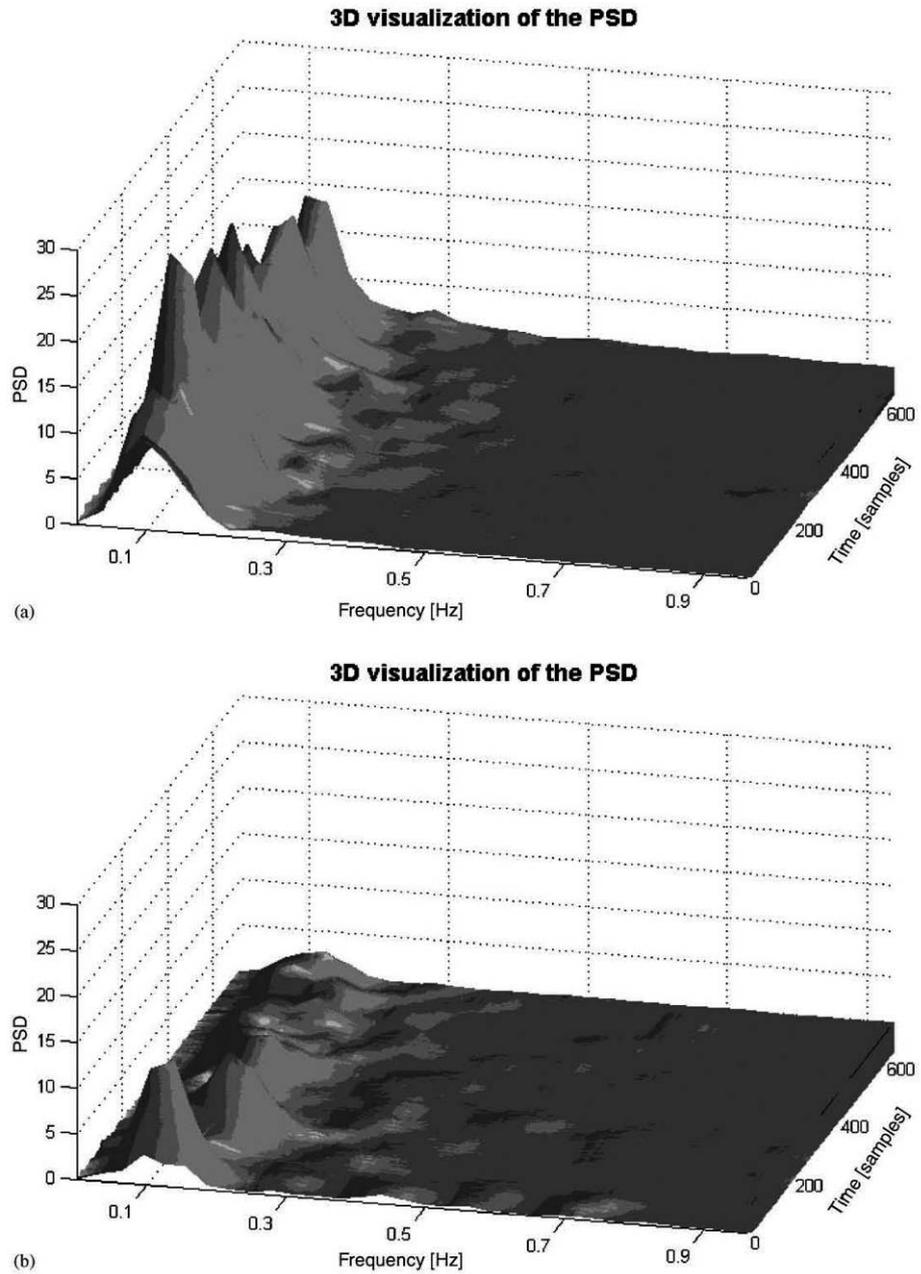


Fig. 6. (a) Average PSD of RF, (b) average PSD of NRF; both corresponding to 39th week's gestation.

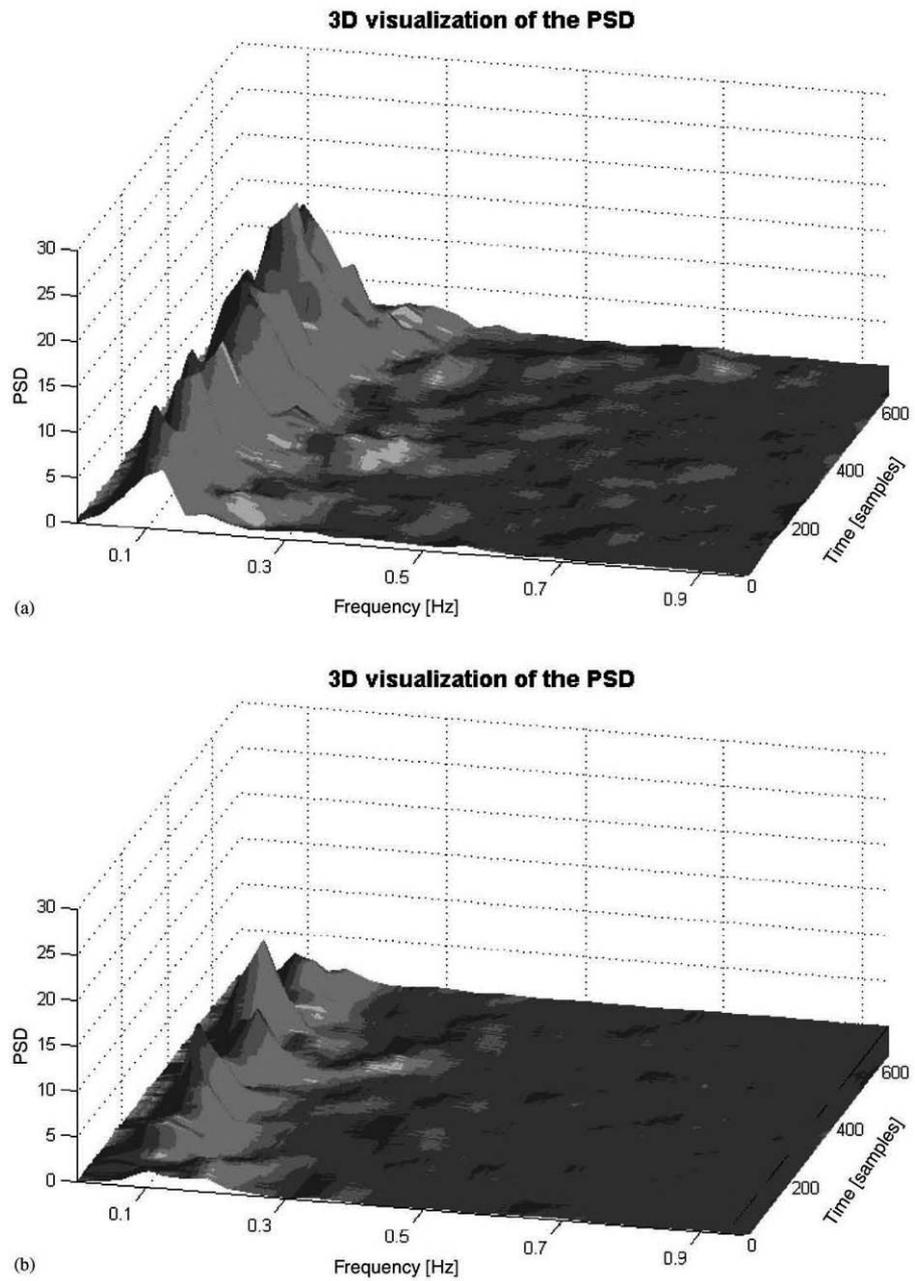


Fig. 7. (a) Average PSD of RF, (b) average PSD of NRF; both corresponding to 40th week's gestation.

Table 2  
Parameters evaluated in the range 0–0.2 Hz for the two signal subsets and in each week's gestation

	0–0.2 Hz				
	Maximum amplitude of PSD (bpm <sup>2</sup> /Hz)	Peak frequency (Hz)	Average power (bpm <sup>2</sup> )	SD	Number of segments
RF-37th WG	30,510	0.156	1.532	1.014	16
NRF-37th	11,828	0.125	0.434	0.177	3
RF-38th WG	28,772	0.125	1.715	1.439	15
NRF-38th	8,592	0.156	0.501	0.188	6
RF-39th WG	24,342	0.125	1.609	1.387	15
NRF-39th	9,188	0.156	0.364	0.266	3
RF-40th WG	14,144	0.125	1.138	0.704	9
NRF-40th	6,785	0.125	0.318	0.043	2

application, it is of great importance to estimate fetal reactivity to diagnose fetal distress, but its interpretation is still uncertain. As for adults, HRV frequency analysis is a non-invasive and powerful method to investigate ANS activity, which in turn can provide information about overall fetal state and reactions. Indeed, fetal HRV is a good indicator of fetal well-being in non-stress conditions. The aim of this study is to characterise fetal reactivity proposing new fetal HRV frequency parameters to support a more exhaustive CTG analysis. 95 CTG signals were considered for the analysis and expert clinicians were asked to divide them into two categories: reactive fetuses (RF) and non-reactive fetuses (NRF) (A fetus is defined as reactive if two or more accelerations are identified within a 20 min CTG. The fetus is declared non-reactive if the variability of the FHR is very tiny even in presence of fetal movements). Frequency analysis of fetal HRV was carried out separately for the two signal categories to highlight differences. Characteristics of the average PSD of fetal HRV resulted in strong differences between the reactive and non-reactive categories: amplitude, peak value and mean power of the average PSD resulted higher in reactive with respect of non-reactive signals, within all frequency bands. No considerable difference was observed in the frequency peak position. The populations of the average powers of the two categories, computed in the frequency range 0–0.2 Hz, resulted not completely separated, but partially overlapped. However, reactive population resulted in significant differences (*t*-test) compared with the non-reactive. The obtained results indicate a certain differentiation between reactive and non-reactive fetus signals in frequency domain. This information could be useful to further support physicians' decisions and to improve the knowledge of fetal condition. However, these results must be confirmed by a more extensive analysis. Further study will concentrate on determination of a possible threshold to automatically classify CTG recordings, using these new information.

## References

- [1] H.P. Van Geijn, Developments in CTG analysis, *Bailleres Clin. Obstet. Gynaecol.* 10 (1996) 185–207.
- [2] G.C. Di Renzo, F.J.A. Copray, C. O'Herlihy, H.P. Van Geijn, Maternal-fetal surveillance within the European Community, in: H.P. Van Geijn, F.A. Copray (Eds.), *A Critical Appraisal of Fetal Surveillance*, Elsevier Science, Amsterdam, 1994, pp. 11–15.

- [3] M. Romano, P. Bifulco, M. Cesarelli, M. Sansone, M. Bracale, Average spectrum of FHRV signal corresponding to uterine contractions, Proceedings of the 12th Nordic Baltic Conference on Biomedical Engineering & Medical Physics, Reykjavik, Iceland, June 18–22, 2002, pp. 174–175.
- [4] A. Di Lieto, U. Giani, M. Campanile, M. De Falco, M. Scaramellino, R. Papa, Conventional and computerised antepartum telecardiography: experienced and inexperienced observers versus computerized analysis, *Gynecol. Obstet. Invest.* 55 (2003) 37–40.
- [5] M. Romano, M. Cesarelli, P. Bifulco, M. Sansone, M. Bracale, Development of an algorithm for homogeneous fetal HR signal identification, Proceedings of the EMBEC 2002—2nd European Medical & Biological Engineering Conference, Vienna, Austria, December 4–8, 2002.
- [6] H.P. Van Geijn, Developments in CTG analysis, *Bailleres Clin. Obstet. Gynaecol.* 10 (2) (1996) 185–209.
- [7] L.W. Oppenheimer, R.M. Lewinsky, Power spectral analysis of fetal heart rate, *Bailleres Clin. Obstet. Gynaecol.* 8 (3) (1994) 643–661.
- [8] B. Rosen, D. Soriano, T. Bylander, H. Ortiz-Zuazaga, B. Schiffrin, Training a neural network to recognize artifacts and decelerations in cardiocograms, in: AAAI Spring Symposium on Artificial Intelligence in Medicine, 1996.
- [9] G.S. Dawes, Y.J. Meir, G.P. Madrizzato, Computerized evaluation of fetal heart-rate pattern, *J. Perinat. Med.* 22 (1994) 491–499.
- [10] R. Mantel, H.P. van Geijn, F.J.M. Caron, J.M. Swartjes, E.E. van Woerden, H.W. Jongsma, Computer analysis of antepartum fetal heart rate: 1. Baseline determination, *Int. J. Biomed. Comput.* 25 (1990) 260–261.
- [11] R. Mantel, H.P. van Geijn, F.J.M. Caron, J.M. Swartjes, E.E. van Woerden, H.W. Jongsma, Computer analysis of antepartum fetal heart rate: 2. Detection of accelerations and decelerations, *Int. J. Biomed. Comput.* 25 (1990) 273–286.
- [12] R. Mantel, H.P. Van Geijn, I.A.P. Ververs, F.J.A. Copray, Automated analysis of near term antepartum fetal heart rate in relation to fetal behavioural states: the Sonicaid System 8000, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165 (1991) 57.
- [13] P. Bifulco, M. Cesarelli, F. Fedele, M. Romano, M. Bracale, Analysis of cardiocograms in time and frequency domains, in: Proceedings of MEDICON 2001—IX Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing, Pula, Croatia, June 12–15, 2001, pp. 861–864.
- [14] E. Guzman, A. Vintzileos, M. Martins, C. Benito, C. Houlihan, The efficacy of individual computer heart rate indices in detecting acidemia at birth in growth-restricted fetuses, *Obstet. Gynecol.* 87 (1996) 969–974.
- [15] D.K. Donker, H.P. van Geijn, A. Hasman, Interobserver variation in the assessment of fetal heart rate recordings, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 52 (1993) 21–28.
- [16] R. Depp, K. Kuhlman, Identification and management of the fetus at risk for acidosis, in: A.R. Spitzer (Ed.), *Intensive Care of the Fetus and Neonate*, Cap. 9, pp. 105–122, Mosby, January, 1996, St. Louis, MO.
- [17] C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, L.A.A. Kollèe, J.C.W. Hopman, G.B. Stoeltinga, H.P. van Geijn, Heart rate variability, *Ann. Internal Med.* 118 (6) (1993) 436–447.
- [18] N. Montano, T.G. Ruscone, A. porta, F. Lombardi, M. Pagani, A. Malliani, Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation* 90 (1990) 1826–1831.
- [19] O. Sibony, J.P. Fouillot, M. Benaoudia, A. Benhalla, J.F. Oury, C. Sureau, P. Blot, Quantification of the heart rate variability by spectral analysis of fetal well-being and fetal distress, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 54 (1994) 103–108.
- [20] J. Karin, M. Hirsch, S. Akselrod, An estimate of fetal autonomic state by spectral analysis of fetal heart rate fluctuations, *Pediatric. Res.* 34 (2) (1993) 134–138.
- [21] M.Y. Divon, F.P. Torres, S.Y. Yeh, R.H. Paul, Autocorrelation techniques in fetal monitoring, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151 (1985) 2–6.
- [22] J. Karin, M. Hirsch, C. Sagiv, S. Akesselrod, Fetal autonomic nervous system activity monitoring by spectral analysis of heart rate variations, *IEEE Comput. Cardiol.* (1992) 479–482.
- [23] M. Romano, M. Cesarelli, P. Bifulco, M. Sansone, M. Bracale, Study of fetal autonomous nervous system's response by means of FHRV frequency analysis, in: First International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, Capri, 20–22 March 2003.
- [24] S.M. Menticoglou, The fetal biophysical profile, in: A.R. Spitzer (Ed.), *Intensive Care of the Fetus and Neonate*, Cap. 10, pp. 123–129, Mosby, January, 1996, St. Louis, MO.
- [25] H. van Geijn, A. van Ravenswaaij, J. Hopman, L. Kollèe, G. Stoeltinga, Spectral analysis of heart variability in spontaneously breathing very preterm infants, *Acta Paediatr.* 83 (1994) 473–480.

- [26] P. Bifulco, M. Romano, M. Cesarelli, M. Sansone, Fetal reactivity by means of FHRV frequency analysis. Proceedings of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 24–29 August 2003, Sydney, Australia, [CD-ROM] ISBN 1877040142, Paper no. 3113.

**Maria Romano** received the Laurea degree in Electronic Engineering from the University “Federico II” of Naples, with grades 110/110, discussing the degree thesis “Cardiotocographic signal processing in frequency domain”. She received the Ph.D. in Biomedical Engineering in 2003. In 2005 she received a post-doctorate grant from the University of Napoli “Federico II”. Her main research activities are in the field of biomedical signal and image processing, biomedical and instrumentations. In all these years she has been speaker in many scientific national and international conferences, as documented from the scientific publications.

**Marcello Bracale** received the Laurea degree in Electronic Engineering from the University of Naples in 1965 and his postgraduate specialisation in Biomedical Technologies at the University of Bologna. He is Full Professor of Biomedical Engineering and is directing the BME Unit at the Electronic Engineering Department of the University “Federico II” of Naples. At present he is also Professor in Automation and Organization of Health Care System. He teaches Biomedical topics in undergraduate courses and in the postgraduate schools at the Faculties of Medicine and Surgery at the Universities of Naples. He is a member of the Teaching Board of the Ph.D. in Biomedical Engineering at the University of Bologna. He is the General Secretary of the Associazione Italiana di Ingegneria Medica e Biologica (AIIMB) Italian Member Society affiliated to International Federation for Medical and Biological Engineering. His main fields of scientific and professional interest are: electronic and biological instrumentation, biosignal and data analysis, health care system and management, health telematics and telemedicine. He was nominated Professor Honoris Causa at the Technical University of Cluj Napoca (Romania) Faculty of Electronic Engineering and he received the Honoris Causa Degree in Medicine and Pharmacy from the University of Iasi, Romania. He is President of the Biomedical Engineering Course at the University of Naples. He is member of several Editorial Board of scientific journals.

**Mario Cesarelli** received the Laurea degree in Electronic Engineering from the University of Naples in 1979 and postgraduate specialisation in Biomedical Technologies from the University of Naples. From 1992, he is Associate Professor in Biomedical Engineering and teaches Biomedical Signal Processing at the University “Federico II” of Naples. He also teaches Biomedical topics in undergraduate courses and in the postgraduate schools of the Faculties of Medicine and Surgery at the Universities of Naples. He is a member of the Teaching Board of the Ph.D. in Biomedical Engineering at the University of Bologna. His main fields of scientific interests are: biomedical signal and image processing, health care information system, and biomedical instrumentation. He is member of the Associazione Italiana di Ingegneria Medica e Biologica affiliated with the International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE). He has authored, coauthored many publications in these topics.

**Marta Campanile** received the Laurea degree in Medicine and Surgery from the University “Federico II” of Naples in 1979. She specialised in Gynaecology and Obstetrics with a first-class degree at the University “Federico II” of Naples in 1984. She is a high specialization physician at the University “Federico II” of Naples. Since 1979 she is employed in the Service of Cardiotocography at the University “Federico II” of Naples. Since 2000, she is involved into the first Italian project of conventional and computerised Telecardiotocography, cofinanced by the Campania Region and the University “Federico II”. The project has the aim of improving the perinatal surveillance of high risk pregnant women in the Campania region and in some European countries. She actively collaborates in the clinical and scientific activity related to the telecardiotocography project. She is author and co-author of many publications in national and international journals.

**Paolo Bifulco** received the Laurea degree in Electronic Engineering from the University of Naples in 1993. In 1994 was Visitor Researcher at the University of Southampton, UK. He received the Ph.D. in Biomedical Engineering in 1998. He is Researcher at the Department of Electronic Engineering and Telecommunications of the University “Federico II” of Naples, where he supports educational activity at the laboratory of the Biomedical Engineering Unit. He teaches Clinical Engineering and also other topics about biomedical engineering. His main research activities are in the field of biomedical signal and image processing, biomedical instrumentations and telemedicine. He is author and co-author of scientific publications.

**Marianna De Falco** received the Laurea degree in Medicine and Surgery from the Second University of Naples in 1999. She is attending the course of Specialization in Gynaecology and Obstetrics at the University “Federico II” of Naples. She is involved in research activities regarding the physiopathology of uterine fibromatosis and, particularly, the effect of the medical treatment

and of the most important growth factors in leiomyoma onset and growth. Since 2000, at the Prenatal Care Unit of the University “Federico II” of Naples, she is collaborating to the first Italian project of conventional and computerised Telecardiotocography, cofinanced by the Campania Region and the University “Federico II”. The project was born in Campania and then expanded to some European countries, with the aim of improving the perinatal surveillance of high risk pregnant women. She has been speaker in many scientific national and international conferences. She is author and co-author of many publications in national and international journals.

**Mario Sansone** received Laurea degree in Electronic Engineering in 1997 from University “Federico II” of Naples. He received the Ph.D. in Biomedical Engineering in 2001 at University of Bologna, Italy. From 2001 until 2003 he was Research Assistant at the Department of Electronic Engineering and Telecommunications, Biomedical Engineering Unit at the University “Federico II” of Naples. During 2004 he had a contract as researcher in the framework of a national telemedicine project. At present, he is employed as Engineer at the Computer Centre of the University “Federico II” of Naples. All these years he has been speaker in many scientific national and international conferences, as documented from the scientific publications.

**Andrea Di Lieto** received the Laurea degree in Medicine and Surgery from the University “Federico II” of Naples in 1968. In 1972 he specialised in Obstetrics and Gynaecology with a first-class degree at the University “Federico II” of Naples. In 1977 he attended a training at the Women’s Hospital of the University of Southern California in Los Angeles. He is Associate Professor of Gynecology and Obstetrics and Professor at the School of Specialization in Obstetrics and Gynecology at the University “Federico II” of Naples. He is head physician of Prenatal Medicine at the Department of Obstetrical–Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine of the University Federico II of Naples. From 1996 to 2002 he was a member of the Academic Senate of the University Federico II of Naples. Since 2002 he is a member of the Board of the University “Federico II” of Naples. Since 2000, Prof. Di Lieto is the scientific responsible and the coordinator of the first Italian project of conventional and computerised Telecardiotocography, co-financed by the Campania Region and the University “Federico II”. He has authored more than 300 scientific publications, in national and international journals.

LA TELECARDIOTOCOGRAFIA COMPUTERIZZATA  
PER IL MONITORAGGIO DELLE GRAVIDANZE A RISCHIO:  
QUATTRO ANNI DI ESPERIENZA CON IL SISTEMA TOCOMAT

**Marianna De Falco<sup>1</sup>**, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>,  
Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Elena Ambrosino<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>,  
Liliana Landi<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università "Federico II", Dip. Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e  
Medicina della Riproduzione

**Introduzione:** La cardiotocografia è il più comune metodo di monitoraggio del benessere fetale, prima e durante il parto. L'interpretazione dei tracciati cardiotocografici è soggetta ad una grande variabilità intra- ed inter-osservatori ma l'analisi computerizzata può superare queste limitazioni. In Italia il primo sistema di telecardiotocografia, chiamato TOCOMAT, nasce nel 2000 all'Università Federico II di Napoli. Attualmente, esso connette la centrale operativa universitaria ad 8 unità periferiche dislocate in piccoli ospedali o consultori in Campania e ad una sede presso l'Università Semmelweis di Budapest in Ungheria. I tracciati e i dati delle pazienti, trasmessi via modem alla centrale operativa, sono visualizzati e archiviati dal sistema OB Trace Vue, ed analizzati dal sistema 2CTG2, che effettua l'analisi computerizzata dei tracciati. In pochi minuti, il risultato dell'analisi computerizzata ed il referto medico sono inviati via fax o e-mail all'unità periferica. Questo studio riguarda i primi 4 anni di telemonitoraggio di gravide ad alto rischio; nei primi 2 anni sono state monitorate anche pazienti a basso rischio, per testare le apparecchiature e favorire il training del personale.

**Materiali e Metodi:** Per ogni paziente sono stati registrati in un database i dati anagrafici e le informazioni relative alla gravidanza, al tipo di parto e all'outcome neonatale (per questo parametro, sono stati considerati il peso alla nascita e il punteggio di Apgar). I tracciati sono stati classificati come rassicuranti, non rassicuranti e patologici in accordo con le linee guida internazionali. L'abilità degli operatori delle sedi periferiche nell'analisi dei tracciati è stata testata due volte all'anno con un questionario. Un altro questionario è stato utilizzato per valutare il gradimento degli operatori e delle pazienti.

**Risultati:** Sono stati registrati 4190 tracciati, il 67% da gravide ad alto rischio, il 34% da pazienti a basso rischio. Nel primo gruppo, il 53% dei tracciati era rassicurante, il 35% non rassicurante, il 12% patologico. Nel secondo gruppo, il 70% era rassicurante, il 16% non rassicurante, il 4% patologico. Il 48.9% delle pazienti ha partorito con taglio cesareo. L'outcome neonatale è stato complessivamente favorevole. Il gradimento delle pazienti e degli operatori e l'abilità di questi ultimi sono cresciuti nel tempo.

**Conclusioni:** La telecardiotocografia computerizzata consente una gestione più accurata delle gravide ad alto rischio, attraverso la maggiore efficienza dell'offerta sanitaria, il decentramento della sorveglianza ostetrica ed il miglioramento della qualità di vita delle pazienti residenti lontano da centri adeguatamente attrezzati. Inoltre, il sistema TOCOMAT consente il training continuo del personale sanitario, in ottemperanza alle esigenze delle moderne Scuole di Medicina.

## La medicina dell'età prenatale: dallo stetoscopio ostetrico alla telecardiotocografia computerizzata

A. DI LIETO, M. DE FALCO, M. CAMPANILE, M. SCARAMELLINO, P. SCHIRALDI

PRENATAL MEDICINE: FROM THE OBSTETRIC STETHOSCOPE TO THE COMPUTERIZED TELECARDIOTOGRAPHY

**The aim of this article is to illustrate the history of fetal auscultation from the 19<sup>th</sup> century, when the fetus was considered as an object and the obstetrician as a "mechanic of the birth", to the present age, when the fetus is a subject and the obstetricians have at their disposal all the means they need to confirm his well-being and to early diagnose his pathologies, even using prenatal telemedicine.**

**Key words: Prenatal medicine - Fetus - Heart auscultation - Cardiotocography - Computerised cardiotocography.**

La Medicina dell'età prenatale è la scienza che protegge il nuovo essere già prima del concepimento, controlla lo sviluppo dell'embrione e del feto e cerca di ridurre, per quanto possibile, i rischi al momento del parto.

Il contenuto di questo articolo è stato presentato, come relazione, durante il Corso permanente universitario di perfezionamento in Cardiotocografia convenzionale e computerizzata, istituito dal 1997 presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli studi di Napoli "Federico II", e durante il Corso nazionale di formazione con esami "Metodiche biofisiche di monitoraggio fetale intrapartum: cardiotocografia e tecniche complementari", organizzato nel 2005 dalla Società Italiana di Ecografia in Ostetricia e Ginecologia a Perugia, Brescia, Reggio Emilia, Brindisi, Roma, Monza, Palermo, Siena, Torino, Catania e Napoli.

Pervenuto il 10 aprile 2006.  
Accettato il 9 novembre 2006.

Indirizzo per la richiesta di estratti: Prof. A. Di Lieto, Via Luca Giordano 120, 80127 Napoli. E-mail: dilieto@unina.it

*Unità Operativa Complessa  
di Medicina dell'Età Prenatale  
Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche  
Urologiche e Medicina della Riproduzione  
Università degli Studi di Napoli  
"Federico II", Napoli*

Adolph Pinard (1844-1934) per primo sottolineò che la moderna Puericultura prenatale deve perseguire la ricerca e l'applicazione di tutte le conoscenze relative alla riproduzione, alla conservazione ed al miglioramento della specie umana. L'osservanza dei precetti della profilassi prenatale nel quadro di una migliorata e razionale assistenza alle gravide, avrebbe in tal modo contribuito in maniera determinante alla riduzione della mortalità e morbilità perinatale, che in quell'epoca erano molto elevate. Pinard, preconizzando i moderni concetti sull'igiene e profilassi della gravidanza, affermò la necessità dell'assistenza alle gravide per assicurare condizioni igieniche adeguate indispensabili per se stesse e per i propri figli, sostenne l'allattamento materno e invocò altresì la protezione e l'attenzione continua da parte dei genitori e dello Stato per tutti i bambini <sup>1</sup>.

Giuseppe Tesaro (1899-1988), durante la sua permanenza a Parigi, rimase talmente affascinato da tali teorie da farne un vessillo per tutta la sua vita accademica e professionale e da favorire in Italia l'istituzione di una



Figura 1. — Théophile René Marie Hyacinthe Laënnec (1781-1826).

delle prime cattedre di Puericoltura prenatale.

La moderna concezione di Medicina prenatale è il risultato dell'evoluzione del concetto di protezione della vita fetale maturato negli ultimi due secoli.

L'Ostetricia è una arte antica che nei secoli è stata affidata alla ostetrica, "esperta di parti" come era chiamata in Gallia, dove svolgeva anche una funzione religiosa. In Gallia, e successivamente in Francia, l'Ostetrica era ed è tuttora chiamata *sage-femme* o anche *Hewamm*, dal tedesco *Hebamme* (la madre che prende il neonato), termine derivante dall'antico tedesco *Heviana* o *Hevanna* (*heben* = tenere e *ana* = nonna), che poi in Italia è divenuto nel volgo "mammana" o "vammana".

Nei secoli XVIII e XIX il Chirurgo-Raccogliatore veniva chiamato al capezzale della gravida quando il travaglio o il parto non procedevano in maniera fisiologica e l'ostetrica o "levatrice" ravvisava la necessità di un intervento medico o chirurgico<sup>2</sup>. In quegli anni, i movimenti attivi e l'attività cardiaca del feto non erano conosciuti né studiati ai fini della valutazione delle condizioni fetali, in parte anche per la mancanza di apparecchiature adeguate<sup>3</sup>.

### Storia dell'auscultazione fetale

L'era dell'Ostetricia moderna inizia nel 1821 con la sensazionale scoperta dell'auscultazione del cuore fetale, che permette all'Ostetrico di non essere più sordo agli appelli del feto ma di mettersi ad ascoltarlo. Essa ha origine in Bretagna ad opera del conte Théophile René Marie Hyacinthe Laënnec (1781-1826) e del suo amico Jacques Alexandre Le Jumeau visconte di Kergardec (1787-1877).

Laënnec (Figura 1), titolare della cattedra di Clinica Medica all'Ospedale Necker della Facoltà di Medicina di Parigi, descrisse i segni clinici e le lesioni delle principali patologie polmonari e cardiocircolatorie, con il termine "cirrosi" epatica ed ipotizzò per la tubercolosi un agente eziologico infettivo non visibile ad occhio nudo (più tardi il bacillo sarebbe stato scoperto da Robert Koch)<sup>3</sup>.

Fino agli inizi del 1800 l'ascoltazione dei polmoni e del cuore veniva eseguita appoggiando direttamente l'orecchio sulla parete toracica e sull'area cardiaca, con ovvie difficoltà, non solo di carattere tecnico, ma anche legate ad un certo pudore delle pazienti nel sottoporsi a questo tipo di visita.

Laënnec fu il primo ad utilizzare per l'auscultazione un quaderno arrotolato e appoggiato al torace, ed in seguito un cilindro di legno svasato alle due estremità e cavo all'interno, in modo da creare una camera d'aria attraverso la quale i suoni venivano amplificati, che fu chiamato *stetoscopio* (*stethos* = pectus), *tubus acusticus*, *pettoriloquio*, *cilindro*, *bastone* o *cornetto* (Figura 2). Egli, anche perchè aveva un orecchio musicalmente esercitato, da provetto suonatore di flauto, fu in grado di effettuare l'auscultazione mediata degli organi endotoracici, dei quali percepiva suoni e rumori, come soffi, rantoli crepitanti e subcrepitanti, cigolii, sibili, sfregamenti, definendone le caratteristiche ed il significato clinico, e confrontandoli con i riscontri autoptici.

L'inventum novum messo a punto nel 1816 da Laënnec ed evoluto successivamente in fonendoscopio doveva diventare il simbolo dell'arte medica. I suoi studi molto accurati di semeiotica auscultatoria furono pubblicati



Figura 2. — L'evoluzione dello stetoscopio ostetrico, dal cilindro di Laënnec allo stetoscopio di Pinard.

nel 1819 nel "De l'auscultation Médiante" e nel "Traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration" ed hanno rappresentato una grande trasformazione della medicina passando, in meno di due secoli, dallo stato approssimativo a quello della scienza spesso esatta <sup>4</sup>.

Laënnec morì di tubercolosi all'età di 45 anni, dopo che non solo i medici a lui ostili ma perfino i bambini per strada si erano beffati di lui agitando le mani come le ali di una farfalla, il misterioso e svolazzante agente specifico della tubercolosi <sup>4</sup>.

Kergaradec (Figura 3), nato a Morlaix da famiglia aristocratica, restò orfano in tenera età durante la rivoluzione francese, per cui fu allevato dal nonno, che seppe con grande acume stimolare gli interessi del nipote. La sua educazione fu affidata ad un gesuita, padre Etienne Sébastien de la Tour, che trasmise al piccolo Alexandre l'amore per la cultura classica greca e latina, che gli servì moltissimo nella sua vita professionale. All'età di 12 anni Alexandre entrò nell'Ospedale di Morlaix ed a 13 anni assistette alla sua prima autopsia <sup>4</sup>.

A Parigi Kergaradec incontrò Laënnec ed iniziò con lui uno straordinario periodo di sano agonismo negli studi di anatomia patologica associati alla clinica medica.

Kergaradec utilizzava lo stetoscopio nell'auscultazione del cuore e del polmone dell'adulto e in molte occasioni fu costretto a

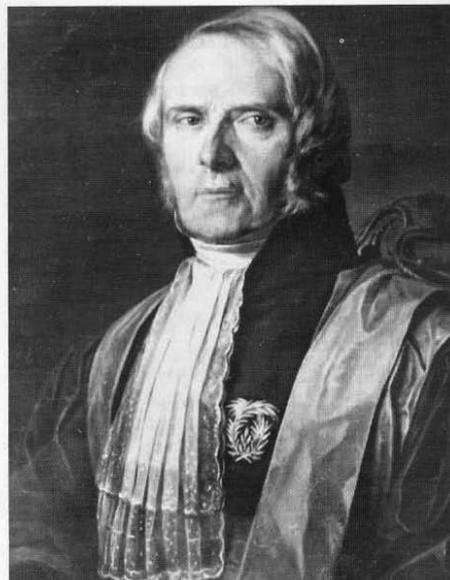


Figura 3. — Jacques Alexandre Le Jumeau di Kergaradec (1787-1877) (Immagine concessa dalla Bibliothèque des Amours Jaunes - Ville de Morlaix, Francia).

difendere, anche in maniera vigorosa, l'amico Laënnec da attacchi ingiusti. Infatti, il 15 giugno 1818 presso la Société de Médecine di Paris e il 24 giugno dello stesso anno presso l'Athénée Medical, cenacolo molto selettivo dell'élite medica, impose la presentazione dello studio critico del Trattato di Laënnec.

Ma è nel 1819 che Kergaradec cominciò ad utilizzare il cilindro di Laënnec per auscultare il battito cardiaco fetale <sup>4</sup>. Laënnec in proposito affermò che non avrebbe mai sognato di applicare l'auscultazione mediata allo studio dei fenomeni della gravidanza ed in particolare all'esame della frequenza cardiaca fetale e riconobbe la genialità dell'intuizione avuta da Kergaradec.

Kergaradec descrive con una certa emozione la sua prima auscultazione sulla gestante: la gravida era vestita e addossata al montante del letto, egli mette un ginocchio a terra, come nel corso di una visita ostetrica, con un cilindro di Laënnec (33 cm di lunghezza e 3,8 cm di diametro) ascolta l'addome — questo metodo gli sembrava più pu-

dico dell'auscultazione diretta — e improvvisamente percepisce il celebre “tic-tac” del cuore fetale. Egli riferisce — “sembra che un orologio situato vicino mi faccia ascoltare i battiti” e pensa addirittura che “si tratti forse di una illusione uditiva”.

Kergaradec, pur essendo assolutamente estraneo alla pratica dei parti, pubblicò nel 1822 “Mémoire sur l'auscultation appliquée à l'étude de la grossesse”, dove raccolse una serie di accurate osservazioni semeiologiche, che anticipano di circa 150 anni le moderne scoperte sulla fisiopatologia cardiocircolatoria fetale.

L'intuizione geniale di Kergaradec fu che a modifiche nella forza e nella frequenza dei battiti del cuore fetale potessero corrispondere variazioni dello stato di benessere del feto. Egli addirittura descrisse la doppia pulsazione del cuore fetale, distinguendola dal battito cardiaco materno, affermò che l'auscultazione ostetrica era possibile dai quattro mesi e mezzo di gravidanza in poi e comprese che la sede del focolaio di massima ascoltazione dipendeva dalla posizione e dalla presentazione del feto. Il suo udito era così acuto e raffinato che egli riusciva a calcolare la frequenza cardiaca fetale, osservando anche che essa tendeva a diminuire nel corso della gravidanza. Infatti, descrisse una frequenza cardiaca fetale di 143-148 battiti per minuto, che dopo 15 giorni si ridusse a 123-130 battiti per minuto. Kergaradec, inoltre, sostenne con forza che l'auscultazione doveva essere realizzata non solo in gravidanza ma anche durante il travaglio di parto. Egli sollecitava ripetutamente gli ostetrici a praticare l'auscultazione del cuore fetale in maniera sistematica e frequente, in modo da arricchire sempre più le esperienze tecnico-scientifiche <sup>4</sup>.

Purtroppo, come molte volte accade agli spiriti illuminati che anticipano i tempi, gli avversari cominciarono a denigrare la scoperta di Kergaradec. Essi affermarono che già nel 1818 un certo Mayor, di Ginevra, aveva ascoltato i rumori fetali, anche se non aveva pubblicato i risultati della scoperta.

Inoltre, spesso agli apprezzamenti per la felice applicazione clinica dello stetoscopio in ostetricia si alternavano l'ironico scetticismo

o i sarcasmi agro-dolci degli Ostetrici di grande fama. Esempio di tale scetticismo è la lettera che Forestier, vecchio Ostetrico atrabiliare (ancora fedele alla terminologia introdotta da Ippocrate), membro dell'Accademia Reale di Chirurgia di Parigi, scrisse a Kergaradec. In essa, dopo aver criticato la giovane età di Kergaradec e sottolineato che non era un Ostetrico, ma un internista, Forestier definì lo stetoscopio ostetrico un ninnolo, espressione e sinonimo di ignoranza, in quanto il vero Ostetrico “deve trovare alla punta del dito il proprio orecchio, il proprio occhio e tutta la propria scienza” <sup>4</sup>.

Non solo Laënnec e Kergaradec furono derisi e osteggiati dai contemporanei. William Harvey (1578-1657), scopritore della circolazione sanguigna ed autore della “Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus”, fu considerato matto e definito in senso dispregiativo “circolatore”. L'ungherese Ignaz Philipp Semmelweis (1818-1865) nell'Ospedale generale di Vienna dimostrò come la febbre puerperale fosse causata da un “virus” trasmesso dalle mani infette degli Ostetrici, reduci dalle sale d'autopsia, e come bastasse disinfettarsi le mani per ridurne drasticamente l'incidenza. Il medico austriaco Ferdinand von Hebra (1816-1880), riferendosi all'assurda incomprendenza dei medici nei confronti della scoperta di Semmelweis, ebbe a dire che “*Quando si farà la storia degli errori umani, difficilmente si potranno trovare esempi di tale forza. E si resterà stupiti che uomini competitivi, così specializzati, potessero nella propria scienza rimanere così ciechi e stupidi*”. Purtroppo, spesso le dottrine vigenti esigono una devozione che non tollera l'eresia, e i fatti nuovi che minacciano la sicurezza dello status quo possono essere attaccati con il fanatismo intollerante dell'inquisitore.

Nonostante tutto, il libro di Kergaradec venne tradotto in inglese e tedesco e le sue teorie e osservazioni cominciarono a diffondersi in tutta l'Europa. I seguaci e gli estimatori di Kergaradec si moltiplicarono, apportando linfa vitale alla dottrina sulla auscultazione ostetrica.

Alexandre Le Jumeau de Kergaradec morì nel 1877: egli, estraneo all'arte ostetrica, era

stato responsabile e artefice di una vera rivoluzione, in quanto il feto non era più considerato un oggetto, ma un soggetto. Grazie alle accurate e rigorose osservazioni realizzate con lo stetoscopio, l'Ostetrico cessava di essere sordo agli appelli del feto e si metteva al suo ascolto; egli non rappresentava più un "meccanico della nascita" ma, per la prima volta, si apriva ai campi della biologia e della fisiopatologia della gravidanza e del prodotto del concepimento.

Circa settanta anni dopo la morte di Kergaradec, Depaul (1847) sottolineò l'importanza dei rallentamenti transitori dei battiti cardiaci fetali durante le contrazioni, e mise in evidenza che la compressione del cordone o della placenta e le contrazioni irregolari e tetaniche dell'utero conducono a risultati identici, una specie di asfissia, in cui il cuore è uno dei primi organi a ricevere un'influenza sfavorevole. Inoltre, egli identificò alcune diminuzioni transitorie della frequenza cardiaca fetale, più frequentemente riscontrate alla fine del travaglio e dopo la rottura prematura delle membrane ed associò alcune di queste decelerazioni alle modifiche della circolazione del sangue nel distretto materno, placentare e fetale in concomitanza o dopo contrazioni uterine<sup>3</sup>. Egli sottolineò che, in caso di asfissia, mentre nell'adulto la risposta cardiaca è la tachicardia, nel feto compare la bradicardia. In quegli anni furono identificati i differenti gradini del distress fetale: decelerazioni sincrone con le contrazioni, pericolose se intense (Depaul), decelerazioni tardive più pericolose (Bodson 1831, Stofft 1831) e progressiva o permanente bradicardia che annuncia la morte fetale (Depaul)<sup>3</sup>.

Kennedy (1833) identificò la possibile influenza della pressione uterina esercitata sulla testa del feto nel determinare modifiche della frequenza cardiaca, anticipando di molto le scoperte di Hon sulle decelerazioni precoci, identificate con il cardiocardiografo<sup>3</sup>. Kilian (1849) propose le indicazioni cliniche ottenute con lo stetoscopio per l'applicazione del forcipe, precisando che il suo utilizzo doveva realizzarsi quando la frequenza cardiaca fetale diminuiva a meno di 100 battiti per minuto o superava i 180 battiti al minuto<sup>3</sup>.

Fischer (1867) e Schwartz (1870) descrissero una fase di bradicardia fetale in seguito a compressione della testa fetale<sup>3</sup>. Jaggard (1888) notò che la temperatura materna determinava un'accelerazione della attività cardiaca fetale, il cloroformio deprimeva il muscolo cardiaco con la comparsa di bradicardia, e la ergotamina produceva contrazioni tetaniche, evocando una frequenza cardiaca fetale caratteristica dell'asfissia<sup>3</sup>.

Tarnier (1888) identificò alcuni rallentamenti progressivi e permanenti della frequenza cardiaca fetale, forse quelle decelerazioni tardive seguite da bradicardia prolungata che la cardiocardiografia scoprirà dopo quasi due secoli<sup>3</sup>!

Nel 1890, Pinard modificò il cilindro di Laënnec e creò lo stetoscopio che prende il suo nome e che attualmente viene usato in tutto il mondo per l'auscultazione delle gravide (Figura 2).

Sempre nel XIX secolo, Andreas Doppler (1803-1853), matematico, fisico e astronomo austriaco, identificò l'effetto "Doppler" del cambiamento di tonalità dovuto ad uno spostamento della frequenza delle onde sonore in avvicinamento o in allontanamento, che sarebbe stato poi utilizzato in tutto il mondo per il monitoraggio elettronico della frequenza cardiaca fetale e per lo studio ecografico del flusso ematico nel distretto vascolare materno-fetale.

Nel 1906, Cremer registrò il primo elettrocardiogramma fetale utilizzando elettrodi addominali e vaginali collegati ad un galvanometro<sup>5</sup>.

Solo nel 1917 Ernest Bumm, Ostetrico tedesco, descrisse le modifiche della frequenza cardiaca fetale *intrapartum* e il loro significato fisiopatologico<sup>6</sup>.

Circa cento anni erano passati dall'epoca di Laënnec e Kergaradec, ma senza che la tecnica dell'auscultazione fetale conoscesse significativi avanzamenti tecnici e scientifici.

### **La cardiocardiografia convenzionale e computerizzata**

Alla metà del secolo scorso risalgono i primi tentativi di registrazione elettrocardiogra-

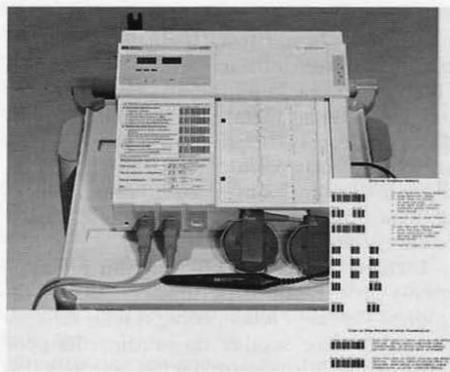


Figura 4. — Un esempio di cardiocrografo, per la registrazione simultanea della frequenza cardiaca fetale e dell'attività contrattile uterina.

fica fetale. Infatti, nonostante le difficoltà tecniche nell'acquisizione ed interpretazione del segnale, l'elettrocardiografia fetale è l'unica tecnica in grado di fornire un tracciato della frequenza cardiaca fetale privo di artefatti, in quanto basato sull'analisi dell'intervallo R-R. Nel 1954, Caldeyro-Barcia sperimentò il posizionamento di elettrodi sul corpo fetale e sull'addome materno<sup>7</sup>. Successivamente, nel 1963, Hon comprese che solo il posizionamento degli elettrodi sullo scalpo fetale poteva consentire una drastica riduzione dei segnali di disturbo, seppure con il limite dell'invasività della metodica e delle conseguenti possibili complicanze<sup>8</sup>.

Pressoché negli stessi anni, Steer (1951)<sup>9</sup>, Hellman (1965)<sup>10</sup> e Goodlin (1979)<sup>11</sup> sperimentarono la registrazione fonocardiografica della frequenza cardiaca fetale. Un microfono veniva applicato sull'addome materno e rilevava i rumori cardiaci fetali. Il limite principale di questa tecnica era l'interferenza determinata dai rumori addominali e dai rumori esterni, con conseguente elevata incidenza di artefatti della registrazione.

Negli anni Sessanta si riesce finalmente ad applicare la registrazione ultrasonografica mediante trasduttori posizionati sull'addome materno alla rilevazione dei pattern di frequenza cardiaca fetale e nasce la cardiocrografia, che consente la registrazione contemporanea della frequenza cardiaca fetale e

dell'attività contrattile uterina (Figura 4). Caldeyro-Barcia (1960)<sup>7</sup>, Hon (1968)<sup>12</sup> e Hammacher (1968)<sup>13</sup>, mediante la cardiocrografia, dimostrarono chiaramente che le decelerazioni tardive avevano un significato prognostico sfavorevole. In particolare, Hon elaborò concetti di fisiopatologia cardiocircolatoria fetale ancora fondamentali per la comprensione del significato fisiopatologico delle decelerazioni in rapporto all'attività contrattile uterina. In Europa, il primo cardiocrografo commerciale è stato introdotto da Hammacher nel 1968.

Attualmente, nell'ambito della nuova semeiotica fetale la cardiocrografia dopo la 26<sup>°</sup> settimana rappresenta un controllo irrinunciabile per il monitoraggio del feto a rischio, la valutazione del suo stato di benessere e la prognosi perinatale<sup>14</sup>. In tutto il mondo, la maggior parte delle decisioni relative all'assistenza al parto di feti con sospetto distress è legata alle informazioni raccolte attraverso l'utilizzo della cardiocrografia. Nel 2005, l'American College of Obstetricians and Gynecologists<sup>15</sup> ha riportato che nel 2002 circa l'85% dei feti negli USA è stato monitorato durante il travaglio di parto con la cardiocrografia, che rappresenta pertanto la procedura ostetrica più comunemente eseguita.

Nonostante l'attuale ampia diffusione della cardiocrografia, alcune considerazioni ne hanno messo in dubbio la validità. In particolare, durante il travaglio di parto, un pattern cardiocrografico normale è considerato un buon indicatore di benessere fetale, mentre un test anormale ha una scarsa predittività nei confronti della sofferenza fetale ipossica ed è gravato da un numero elevato di falsi positivi, con conseguente ricorso ad interventi ostetrici non necessari. Tale limitata validità della cardiocrografia non deve però sorprendere, se si considera che inizialmente questa tecnica è stata introdotta spesso su basi empiriche, con conoscenze incomplete della fisiopatologia cardiocircolatoria fetale e delle implicazioni cliniche legate ai pattern cardiocrografici anormali. Inoltre, manca un accordo generale sui criteri di lettura ed interpretazione dei tracciati cardiocrografici e l'introduzione simultanea di linee guida in

differenti continenti ha contribuito a determinare confusione nella nomenclatura e nelle definizioni.

Numerosi sono i sistemi di lettura del tracciato cardiocografico proposti, ma nessuno si è imposto come standard. Anche adottando le stesse regole, vi è una scarsa concordanza intra- ed inter-osservatore nella interpretazione dei tracciati<sup>16,17</sup>. Inoltre, l'esame visivo del tracciato cardiocografico non è in grado di estrarre tutte le informazioni contenute nel segnale della frequenza cardiaca fetale.

Per questi motivi, e non essendo disponibile una valida alternativa alla cardiocografia, che rappresenta tuttora l'unica metodica per il monitoraggio della frequenza cardiaca fetale, all'inizio degli anni Novanta Dawes ha introdotto l'elaborazione computerizzata del tracciato cardiocografico, mediante l'utilizzo di software dedicati che permettono un'analisi obiettiva e riproducibile, superano i limiti della valutazione visiva tradizionale e riducono la variabilità intra- ed inter-osservatori<sup>18</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato come l'accordo tra gli osservatori ed il computer sia buono per la definizione di parametri come la linea di base della frequenza cardiaca fetale, in cui la maggior precisione del sistema computerizzato non risulta fondamentale per una corretta valutazione, ma sia invece scarso per la definizione di altri parametri, come la variabilità basale, difficile da determinare con esattezza con la sola interpretazione visiva<sup>19-22</sup>. Inoltre, i software per l'analisi computerizzata consentono lo studio di parametri aggiuntivi rispetto alla valutazione tradizionale, come la short term variability, l'analisi spettrale e l'entropia approssimata, che sembrano correlare in modo più specifico con l'effettivo stato di ossigenazione del feto<sup>23</sup>. L'applicazione dello studio di tali parametri alla pratica clinica potrebbe consentire una migliore gestione dei casi in cui il tracciato cardiocografico è sospetto alla lettura tradizionale, limitando gli interventi ostetrici alle sole situazioni in cui l'ossigenazione del feto è effettivamente compromessa. In tal modo, la cardiocografia computerizzata potrebbe superare un altro limite della cardiocografia convenzionale,

cioè il fatto di essere associata all'aumento del numero di interventi ostetrici non necessari, a causa dell'elevata incidenza di falsi positivi di cui è gravata.

Infine, proprio per la maggiore attendibilità, la cardiocografia computerizzata si associa ad una riduzione della durata del monitoraggio e del numero di test aggiuntivi per lo studio del benessere fetale rispetto al metodo tradizionale, consentendo anche una razionalizzazione dei costi per la sorveglianza perinatale<sup>24</sup>.

In futuro, come ulteriore sviluppo della cardiocografia computerizzata, l'utilizzo di reti neurali potrebbe addirittura consentire la creazione di un sistema intelligente o addirittura di una macchina "cosciente" per controllare le condizioni fisiopatologiche del feto.

### **La telemedicina prenatale e la telecardiocografia**

La disponibilità di sistemi per la cardiocografia computerizzata è anche alla base dell'utilizzo di tale tecnica nell'ambito della Telemedicina prenatale.

La Telemedicina origina dall'utilizzo combinato di apparecchiature elettromedicali, tecnologie informatiche e sistemi per le telecomunicazioni, allo scopo di assicurare la diagnosi, il consulto specialistico ed il monitoraggio a distanza anche a pazienti residenti in luoghi lontani da centri sanitari adeguatamente attrezzati. La Telemedicina prenatale applica tali innovazioni alla sorveglianza perinatale, particolarmente in caso di gravidanze a rischio. In particolare, la Telecardiocografia ha lo scopo di ridurre il sovraccarico delle strutture ambulatoriali e il numero di ricoveri di lunga durata effettuati allo scopo di consentire un monitoraggio fetale intensivo. I primi sistemi per la trasmissione telematica di tracciati cardiocografici sono stati realizzati da Dalton, soprattutto allo scopo di effettuare il monitoraggio domiciliare della frequenza cardiaca fetale<sup>25-27</sup>.

In Italia, il primo e tuttora unico sistema di telecardiocografia, chiamato TOCOMAT, è attivo dal 1999 presso il Dipartimento di



Figura 5. — La Centrale Operativa del sistema TOCOMAT di Telemedicina prenatale e Telecardiotocografia convenzionale e computerizzata.

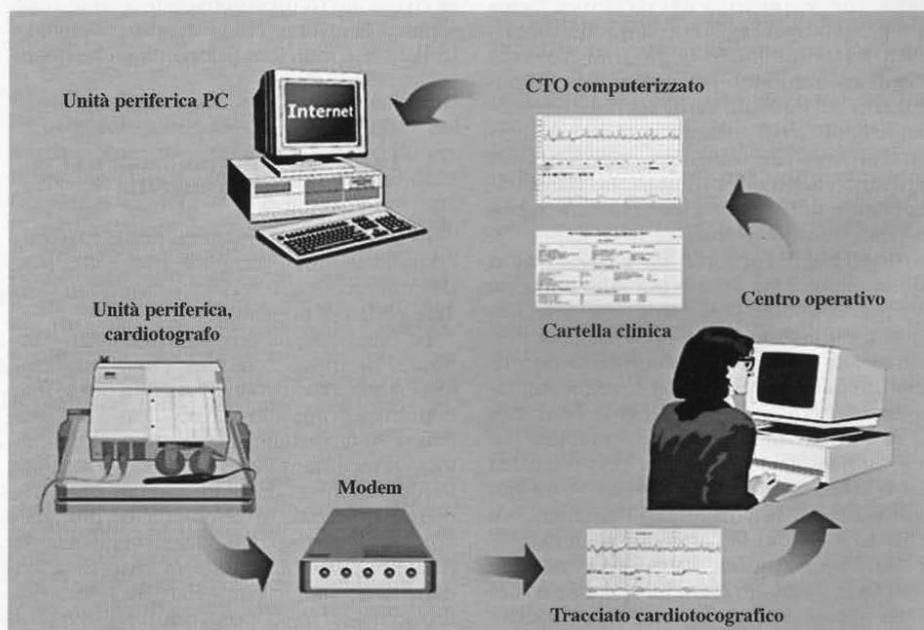


Figura 6. — Rappresentazione schematica del sistema TOCOMAT di Telemedicina prenatale e Telecardiotocografia.

Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione afferente alla Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II"<sup>28</sup>.

Scopo di tale sistema è assicurare un'assistenza medica specialistica anche a gravide residenti in luoghi disagiati e privi di strutture sanitarie adeguate (isole, piccoli centri ur-

bani ecc.), spesso costrette a frequenti spostamenti o a ricoveri ospedalieri per sottoporsi al monitoraggio cardiocografico. Il progetto ha anche l'obiettivo di consentire un decentramento della sorveglianza ostetrica ed una razionalizzazione dei costi per l'assistenza perinatale, nonché quello di dare impulso all'insegnamento, alla Teledidattica

ed all'aggiornamento professionale continuo a distanza in Campania<sup>29,30</sup>.

Il tracciato cardiocografico, registrato con il metodo tradizionale presso le unità remote, è inviato via modem, insieme ai dati relativi alla paziente, alla centrale operativa universitaria, dove viene visualizzato, analizzato da un operatore esperto e da un software per l'analisi computerizzata ed archiviato in un database (Figura 5). Nel giro di pochi minuti, il tracciato elaborato dal sistema, unitamente al referto medico, vengono inviati via fax o via e-mail all'unità remota di partenza (Figura 6).

Fino ad oggi, il sistema ha consentito la registrazione e l'analisi di circa 5 000 tracciati da 1 500 gravide, soprattutto ad alto rischio. Inoltre, il coinvolgimento di una unità periferica localizzata a Budapest, in Ungheria, testimonia l'intento di diffondere il più possibile, anche ad altri Paesi europei, le tecnologie e le esperienze alla base del sistema TOCOMAT, allo scopo di promuovere l'espansione della Telecardiografia in aree geografiche disagiate prive di questo tipo di servizio<sup>31,32</sup>.

### Conclusioni

Nel settore scientifico-disciplinare della Medicina dell'età prenatale, il progresso clinico è indubbiamente legato all'uso di nuove tecniche, che costituiscono la base per le più grandi conquiste dell'Ostetricia moderna e delle bioscienze proiettate nel futuro<sup>2</sup>.

Vero è che la predilezione del medico per la diagnostica strumentale dipende da vari fattori, come l'esigenza di economizzare il tempo, la scarsa fiducia nella possibilità di giungere ad una diagnosi esclusivamente clinica, il venir meno della necessaria abilità nel compierla, il desiderio di tutelarsi da eventuali accuse di imperizia, nonché le aspettative dei pazienti nei confronti di molte propugandate innovazioni tecnologiche.

Tuttavia, la moderna diagnostica strumentale, nonostante i vantaggi indiscutibili che può apportare alla pratica clinica, dovrebbe rappresentare sempre una attività complementare alla capacità interpretativa e di ra-

giornamento del clinico ed essere applicata solo dopo la formulazione di un'ipotesi di diagnosi sulla base dei sintomi soggettivi e dei segni obiettivi. Solo in tal modo si potrà realizzare un raccordo sistematico tra il management clinico del medico moderno ed i principi propugnati, con tanta perseveranza, da Laënnec e Kergaradec.

### Riassunto

Obiettivo di questo articolo è illustrare il percorso storico che la tecnica dell'auscultazione fetale ha compiuto dall'Ottocento ad oggi, da un'epoca, cioè, in cui il feto era considerato come un oggetto e l'ostetrico un "meccanico della nascita", all'era contemporanea, in cui il feto è soggetto ed il medico dispone dei mezzi necessari a confermarne il benessere e ad individuarne precocemente le patologie, anche mediante l'utilizzo di metodiche come la Telemedicina prenatale.

Parole chiave: Medicina dell'età prenatale - Storia dell'auscultazione fetale - Cardiocografia - Cardiocografia computerizzata - Telemedicina prenatale.

### Bibliografia

1. Tesouro G. La Puericultura prenatale. In: Delle Piane G, Maurizio E, Tesouro G, editors. Trattato italiano di Ginecologia. Novara: Istituto Geografico De Agostini; 1966.p.555-78.
2. Tanaron PP. Il Chirurgo-Raccogliore Moderno. Bassano: Edizioni Remondini; 1798.
3. Sureau C. The history of fetal surveillance. In: van Geijn HP, Copray FJA, editors. A critical appraisal of fetal surveillance. Amsterdam: Elsevier; 1994.p.3-10.
4. Stofft H. Kergaradec à l'écoute du fœtus. J Obstet Biol Reprod 1981;10:611-22.
5. Cremer M. Über die direkte Ableitung der Aktionsströme des menschlichen Herzens vom Oesophagus und über das Electrocardiogram des Fœten. Münchener Medizinischen Wochenschrift 1906;53:811-3.
6. Bumm E. Trattato completo di Ostetricia. Milano: Società Editrice Libreria; 1915.
7. Caldeyro-Barcia R, Poseiro JJ. Control of human fetal heart rate during labour. In: Cassel DE, editor. The heart and circulation in the newborn and infant. New York: Grune & Stratton, Inc; 1966.p.7-36.
8. Hon EH, Lee ST. The fetal electrocardiogram. I. The electrocardiogram of the dying fetus. Am J Obstet Gynecol 1963;87:804-13.
9. Steer C, Hertsch G. Continuous observation of the fetal heart. Am J Obstet Gynecol 1951;62:1139-42.
10. Hellman L. Electronics in obstetrics and gynecology. J Obst Gynaecol Brit Cwilt 1965;72:896-906.
11. Goodlin RC. History of fetal monitoring. Am J Obstet Gynecol 1979;133:323-52.
12. Hon E, Quilligan E. Electronic evaluation of fetal heart rate. Clin Obstet Gynecol 1968;11:145-67.

13. Hammacher K, Huter K, Bokelmann J, Werners P. Fetal heart frequency and perinatal condition of the fetus and newborn. *Gynecology* 1968;166:349-60.
14. Romanini C. La reattività fetale. Roma: Cic Edizioni internazionali; 1984.
15. *Intrapartum* fetal heart rate monitoring. ACOG Practice Bulletin No. 62. 2005;105:1161-9.
16. Flynn AM, Kelly J, Matthews K, O'Connor M, Viegas O. Predictive value of, and observer variability in, several ways of reporting antepartum cardiotocographs. *Br J Obstet Gynecol* 1982;89:434-40.
17. Bernardes J, Costa-Pereira A, Ayres-De-Campos D, van Geijn HP, Pereira-Leite L. Evaluation of interobserver agreement of cardiotocograms. *Int J Gynecol Obstet* 1997;57:33-7.
18. Dawes GS, Meir YJ, Mandruzzato G. Computerized evaluation of fetal heart-rate patterns. *J Perinat Med* 1994;22:491-9.
19. Arduini D, Rizzo G, Giannini F, Garretti GG, Romanini C. Computerized analysis of fetal heart rate: II. Comparison with the interpretation of experts. *J Matern Fetal Invest* 1993;3:165-8.
20. Todros T, Preve CU, Plazzotta C, Biolcati M, Lombardo P. Fetal heart rate tracings: observer versus computer assessment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;68:83-6.
21. Gagnon R, Campbell MK, Hunse C. A comparison between visual and computer analysis of antepartum fetal heart rate tracings. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:842-7.
22. Di Lieto A, Giani U, Campanile M, De Falco M, Scaramellino M, Papa R. Conventional and computerized antepartum telecardiotocography. Experienced and inexperienced observers versus computerized analysis. *Gynecol Obstet Invest* 2003;55:37-40.
23. Arduini D, Rizzo G, Stabile E, Capponi A, Romanini C. Approximate entropy of fetal heart rate in normal and growth-retarded fetuses. *Obstet Gynecol* 1996;87:969-74.
24. Bracero LA, Morgan S, Byrne DW. Comparison of visual and computerized interpretation of non-stress test results in a randomised controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1254-8.
25. Dalton KJ, Dawson AJ, Gough NA. Long distance telemetry of fetal heart rate from patients' homes using public telephone network. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286:1545.
26. Dalton KJ, Hemp J, Dawson AJ, Gough NA. Teleplot: a computing system for objective analysis of fetal heart rate recordings. *Int J Biomed Comput* 1984;15:23-34.
27. Currie JR, Dalton KJ. Fetal home telemetry. *Midwifery* 1986;2:202-5.
28. Di Lieto A, Catalano D, Pontillo M, Pollio F, De Falco M, Schiraldi P *et al.* Telecardiotocography in prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2001;7:119-20.
29. Di Lieto A, Scaramellino M, Campanile M, Iannotti F, De Falco M, Pontillo M *et al.* Prenatal telemedicine and teledidactic networking. A report on the TOCOMAT project. *Minerva Ginecol* 2002;54:447-51.
30. Ippolito A, De Falco M, Triassi M, Di Lieto A. A cost study of prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2003; 9(5):288-91.
31. Di Lieto A, Giani U, Campanile M, De Falco M, Scaramellino M, Papa R. Prenatal telemedicine: clinical experience with conventional and computerized antepartum telecardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;103:114-8.
32. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Papa R, Torok M, Scaramellino M *et al.* Antepartum telecardiotocography: a four year experience. *J Telemed Telecare* 2006, in press.

# Regional and International Prenatal Telemedicine Network for Computerized Antepartum Cardiotocography

Andrea Di Lieto, M.D.,<sup>1\*</sup> Marianna De Falco, M.D.,<sup>1\*</sup> Marta Campanile, M.D.,<sup>1</sup> Miklós Török, M.D.,<sup>2</sup> Spánik Gábor, M.D.,<sup>2</sup> Mariangela Scaramellino, M.D.,<sup>1</sup> Paola Schiraldi, M.D.,<sup>1</sup> and Francesca Ciociola, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Prenatal Care Unit, Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine, University "Federico II," Naples, Italy.

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, National Health Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

\*These authors contributed equally to this work.

## ABSTRACT

The objective of this work was to review the activity of TOCOMAT, a system for antepartum cardiotocographic telemonitoring. Nine peripheral units recorded the traces, transmitted them via modem to the University operation center, where the computerized analysis was performed, and received the medical report within a few minutes, via fax or e-mail. Traces were classified as "reassuring," "nonreassuring," or "pathological." The parameters of computerized analysis were grouped together for each week of gestation. The perinatal outcome was also evaluated. In 5 years, 5830 traces were analyzed: 4372 (75%) from 1344 high-risk patients and 1458 (25%) from 529 patients at apparent low risk. The system allowed the identification of high-risk patients (32.8% with nonreassuring traces and 7.1% with pathologic traces) and low-risk patients (16.3% with nonreassuring traces and 4.3% with pathologic traces) that required further evaluation. The neonatal outcome was good overall. At each week of pregnancy, the mean values of computerized parameters resulted in normal ranges. The TOCOMAT system allowed a decentralization of prenatal surveillance and improved the patients' quality of life and the level of prenatal care.

**Key words:** telemedicine, telehealth, distance learning, conventional cardiotocography, computerized cardiotocography, antepartum cardiotocography, TOCOMAT system

## INTRODUCTION

Cardiotocography (CTG) provides the simultaneous recording of fetal heart rate and uterine contractions using two transducers placed on the maternal abdominal wall. The fetal heart rate is recorded using an abdominal Doppler ultrasound transducer, while uterine contractions are estimated using an abdominal wall pressure sensor. In the last half of pregnancy, practically all pregnant women at risk submit to this examination, with a frequency ranging from daily to weekly.<sup>1,2</sup> Traditionally, the cardiotocographic trace is interpreted in a visual manner, but with high intra- and interobserver variability.<sup>3,4</sup> The computerized analysis, if compared with the visual reading, allows a more objective interpretation, provides further parameters, such as short-term variability and approximate entropy, more specifically related to fetal hypoxia,<sup>5</sup> and seems to be associated with less time spent in testing and with a reduction in the number of additional examinations to be performed for the fetal well-being evaluation.<sup>6</sup>

One of the applications of telemedicine in obstetrics is the distance recording of cardiotocographic traces. The use of telemetry applied to cardiotocographic recording, in 1983, represents the first description of a distance cardiotocographic transmission.<sup>7</sup> Subsequently, computerized networks for the distance transmission and analysis of cardiotocographic traces have been described.<sup>8</sup>

In 2000, the first Italian system for antepartum telecardiotocography, called TOCOMAT, began at the Prenatal Care Unit of the Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine of the University "Federico II" of Naples,<sup>9</sup> with the main aim of extending specialized medical expertise to pregnant women who are at high risk requiring antepartum electronic fetal monitoring and who live far from adequately equipped health

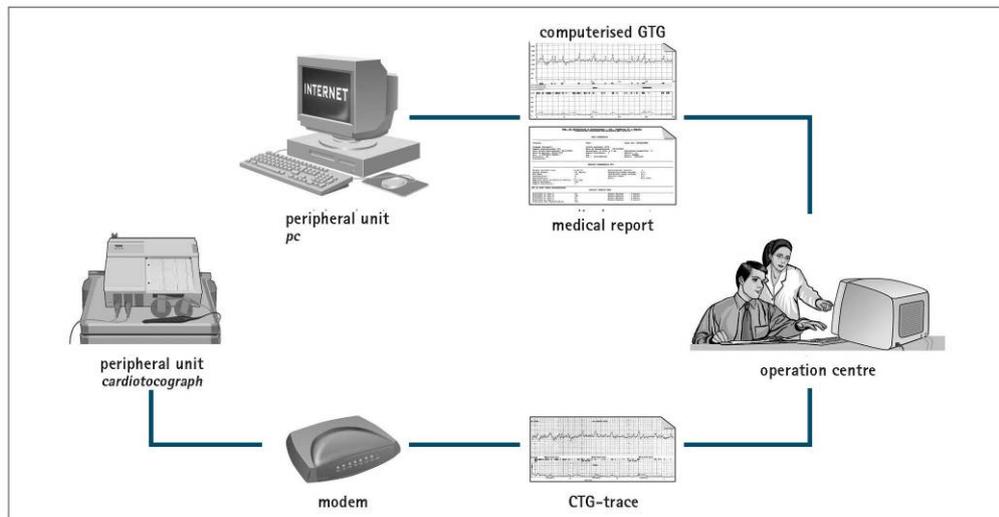


FIG. 1. The TOCOMAT system. CTG, cardiocography.

centers. Data about the first years' operation of the project have been published.<sup>10,11</sup>

The TOCOMAT network connects eight remote units located in small hospitals and consulting rooms of Campania, a region in the south of Italy. The operation center is located in Naples, the regional capital, at the University "Federico II." From 2004, a remote unit located at the Semmelweis University of Budapest (Hungary) has also been working with the system. As previously described,<sup>9,10</sup> peripheral units are equipped with an inexpensive cardiocograph, able to transmit via modem both fetal heart rate traces and data about patients to the operation center. Data are received there, displayed, and stored by a computerized system called OB TraceVue (Philips Medical Systems, Boeblingen, Germany) and analyzed by the 2CTG2 system, a software that performs the computerized analysis of the traces. Within a few minutes, the report of the computerized analysis and the medical report are sent back to the remote unit by fax or by e-mail (Fig. 1).

The aim of the present report was to review the first 5 years of experience with distance antepartum cardiocographic monitoring

of patients with high-risk pregnancies. During the first 2 years, we also accepted traces recorded from patients at apparent low risk, in order to test the system and allow the training of the personnel involved.

#### MATERIALS AND METHODS

Demographic data of each patient and information about pregnancy risk factors were recorded and stored in a database, together with the method of delivery, the birth weight of the newborn, the Apgar score, and the need for neonatal intensive care unit stay.

Basing on both the computerized analysis and the ranges provided by the International Federation of Gynaecology and Obstetrics<sup>12</sup> and the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists,<sup>13</sup> the doctors working at the operation center classified the traces as "reassuring," "nonreassuring," and "pathological." In case of a "nonreassuring" trace, further examinations of fetal conditions (i.e., by ultrasonography) and the repeat of the trace were recommended, while urgent hospitalization was recommended in case of a pathological trace.

The parameters of computerized analysis were stored in spread-

**Table 1. Characteristics of Patients and Number of Recorded Traces**

	PATIENTS AT APPARENT LOW RISK	PATIENTS AT HIGH RISK
Number of patients	529 (28.2%)	1,344 (71.8%)
Age (mean ± SD)	26.88 ± 7.25	27.53 ± 6.78
Parity	0.58 ± 1.05	0.60 ± 1.28
Total number of recorded traces	1536	4475
Number of repeated traces	78	103
Total number of analyzed traces	1,458 (25%)	4,372 (75%)

sheet files (Excel, Microsoft) and grouped together for each gestational week, since the 31st week for high-risk pregnancies and since the 37th week for apparent low-risk pregnancies. We considered basal heart rate (beats/min), number of large accelerations/hour, number of small accelerations/hour, short-term variation (STV, ms), long-term variability, Delta variation (beats/min), Interval Index, and Approximate Entropy (ApEn). Particular importance was given to the ApEn, which is an application of the chaos theory to the study of fetal cardiac frequency.<sup>14</sup> In growth-retarded fetuses, ApEn seems to be more predictive of fetal acidosis than STV.<sup>15</sup>

Percentiles and normality curves proposed by Arduini et al.<sup>16</sup> were used to analyze the above variables in relation to gestational age. The 2CTG2 system also performs a spectral analysis of the traces, as further indicator of fetal autonomic nervous system activity.<sup>17-20</sup>

**RESULTS**

Pregnant women at apparent low risk (*n* = 529) and at high risk (*n* = 1,344) were monitored during the first 5 years (Table 1). In total, 6,011 traces were recorded. Of these traces, 181 (3%) were repeated because of technical problems or inadequacy. Excluding them, 4,372 (75%) traces were recorded from pregnant women at high risk and 1,458 (25%) from women with pregnancy at apparent low risk, with a total of 5,830 good quality traces. The most common reason for monitoring high-risk patients was preterm labor (Fig. 2). Patients at

apparent low risk had an average of 2.75 traces each, whereas patients at high risk had 3.25 traces each.

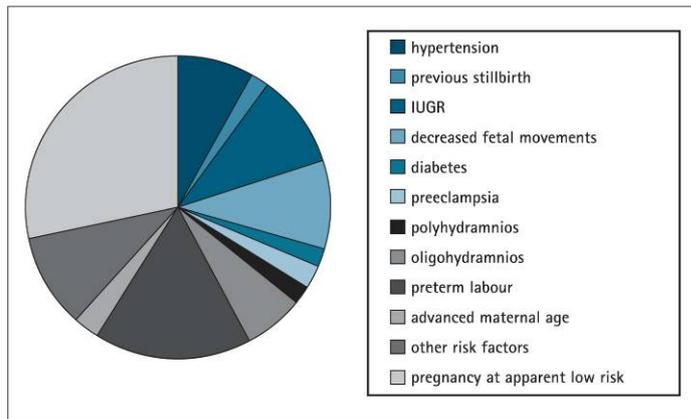
In the group at apparent low risk, 420 patients (79.4%) had “reassuring” traces, 86 patients (16.3%) had at least one “nonreassuring” trace, and 23 patients (4.3%) had at least one “pathological” trace. In the group at high risk, 807 patients (60.1%) had “reassuring” traces, 441 patients (32.8%) had at least one “nonreassuring” trace, and 96 patients (7.1%) had at least one “pathological” trace.

At each week of pregnancy, the mean values of CTG parameters analyzed by the 2CTG2 system resulted in being included in the normal ranges provided by Arduini et al.<sup>16</sup> (Table 2).

Data about type of delivery and perinatal outcome are reported in Table 3. We did not observe any false-negative results. A case of intrauterine fetal death at 31 weeks of gestation occurred in the group at high risk. Cesarean sections were performed on 50.8% of patients (31% of apparent low-risk patients and 58.6% of high-risk patients). Neonatal intensive care admission included 13 newborns (1 from a patient at apparent low risk and 12 from patients at high risk), with overall good outcomes.

**DISCUSSION**

During the last trimester of pregnancy, CTG is the most widespread method for the evaluation of fetal well-being. Even if the validity of antepartum CTG in patients at low risk is still debated, practically



**FIG. 2. Reasons for telecardiotocographic monitoring.**

Table 2. Mean Values of CTG Parameters at Each Week of Gestation in the Monitored Patients

WEEK OF GESTATION	FHR (bpm)	LARGE ACCELERATIONS/HOUR	LITTLE ACCELERATIONS/HOUR	STV (msec)	LTI	DELTA VARIATION (bpm)	INTERVAL INDEX	APPROXIMATE ENTROPY
<i>Patients at high risk</i>								
31	142.11	1.98	3.27	5.66	17.01	13.97	4.80	1.09*
32	145.18	4.35	5.19	5.72	17.85	12.72	5.28	1.29
33	143.81	7.73	6.01	4.88	18.11	12.33	6.32	1.24
34	134.85	13.38	5.30	7.80	16.28	13.45	4.50	1.20
35	135.32	11.87	3.98	7.52	19.01	14.23	3.92	1.18
36	136.57	15.12	4.58	6.49	21.59	12.55	5.13	1.24
37	134.86	14.31	7.31	6.75	18.2	13.24	4.86	1.20
38	135.53	15.29	5.03	6.07	21.30	12.92	6.24	1.19
39	135.78	14.23	6.25	6.85	23.99	13.35	6.31	1.17
40	136.28	10.23	5.48	5.91	24.15	12.18	5.92	1.28
41	128.12	9.39	4.12	6.03	19.86	11.23	4.16	1.31
42	125.65	9.95	5.48	5.23	22.17	10.40	4.95	1.31
<i>Patients at apparent low risk</i>								
37	135.18	17.71	6.90	6.58	18.45	13.05	4.23	1.25
38	135.75	21.14	8.42	6.80	23.98	13.81	5.39	1.21
39	135.64	17.81	9.13	6.37	28.15	14.23	6.87	1.22
40	136.12	10.25	7.71	5.91	26.11	16.15	7.73	1.37
41	138.06	12.02	6.22	6.10	19.92	11.10	5.97	1.29
42	135.03	15.21	5.33	5.31	21.20	12.37	4.90	1.35

\* The mean value of Approximate Entropy at 31 weeks of gestation is not indicated in the percentiles and normality curves reported by Arduini et al. FHR, basal heart rate; STV, short-term variation; LTI, long-term variability.

all pregnant women submit to this test during the third trimester of pregnancy. In Italy, the request for cardiotocographic monitoring is growing, especially in Campania, one of the regions with the highest birth rate. In spite of this increasing demand, the number of computerized systems for cardiotocographic interpretation available in Campania is very low, due to both the high cost of these systems and to the need for adequately trained personnel.

Therefore, because adequately equipped health centers are often located far from the patients' homes, pregnant women who need to undergo intensive cardiotocographic monitoring are forced to travel or have long hospital stays. Moreover, health workers increasingly request the computerized analysis of cardiotocographic traces because, based on the evidence in the literature, it is more accurate

and objective than the visual one and shows a better correlation with fetal health.<sup>21</sup>

During the first 5 working years of the TOCOMAT system, 1,344 high-risk patients have been monitored staying in their own environment. Moreover, patients were hospitalized only when necessary and admissions were efficiently planned, as a consequence of a continuous interaction between peripheral units and the operations center.

In order to facilitate the training of the operators and to test the equipment, several patients at apparent low risk were included in the first phase of the project. In some of these patients, the cardiotocographic analysis revealed "nonreassuring" or "pathological" patterns that required further evaluation of the fetus or hospitalization.

In all of the monitored patients, the neonatal outcome was good

Table 3. Type of Delivery and Neonatal Outcome

	PATIENTS AT APPARENT LOW RISK (n = 529)	PATIENTS AT HIGH RISK (n = 1344)
Gestational age at delivery	37.9 ± 2.9	38.2 ± 2.1
Neonatal weight (g)	3,142 ± 648	2,985 ± 784
Apgar at 1 min (mean ± SD)	8.2 ± 1.6	7.7 ± 1.5
Apgar at 5 min (mean ± SD)	8.7 ± 0.9	8.1 ± 1.5
Neonatal intensive care unit admission	1 (0.2%)	12 (0.9%)
Group with reassuring traces	420 (79.4%)	807 (60.1%)
Vaginal delivery	311 (74%)	467 (57.9%)
Elective cesarean section	99 (23.6%)	298 (36.9%)
Emergency cesarean section	10 (2.4%)	42 (5.2%)
Group with nonreassuring traces	86 (16.3%)	441 (32.8%)
Vaginal delivery	54 (62.8%)	72 (16.3%)
Elective cesarean section	19 (22.1%)	223 (50.6%)
Emergency cesarean section	13 (15.1%)	146 (33.1%)
Group with pathological traces	23 (4.3%)	96 (7.1%)
Vaginal delivery	0 (0%)	17 (17.7%)*
Elective cesarean section	8 (34.8%)	0 (0%)
Emergency cesarean section	15 (65.2%)	79 (82.3%)

\*1 endouterine fetal death, 16 preterm newborns with a low birth weight.

overall and the computerized parameter values were mostly normal. Increases in the number of preterm births and of cesarean sections are frequently cited examples of the risk associated with the widespread adoption of cardiotocographic recording.<sup>22,23</sup> However, in spite of the substantial number of cases in the present study, mostly high-risk patients, we found a lower cesarean rate (50.8%) in comparison to the 61% rate observed in Campania.<sup>24</sup>

The experience with the TOCOMAT system confirms that prenatal telemedicine may allow a gradual decentralization of obstetric surveillance, with subsequent improvement in the quality of life for mothers and newborns. Moreover, as previously demonstrated,<sup>4,5</sup> computerized CTG in a prenatal telemedicine system increases the efficiency of the service provided to the patients.

Finally, the organization of a telecardiotocography system could allow a large number of peripheral units, although located far from the university operations center or in other countries, to use computerized analysis. The involvement of the Hungarian unit in the TOCOMAT system represents a start point to spread the technologies

used and the expertise required for computerized telecardiotocography to other European countries, with the possible organization of new operation centers and the subsequent expansion of distance cardiotocographic monitoring in areas lacking this kind of service.

REFERENCES

1. Van Geijn HP. Developments in CTG analysis. *Baill Clin Obstet Gynaecol* 1996;10:185-207.
2. Di Renzo GC, Copray FJA, O'Herlihy C, Van Geijn HP. Maternal-fetal surveillance within the European community. In: Van Geijn HP, Copray FA, eds. *A critical appraisal of fetal surveillance*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994:11-15.
3. Devoe LD. Nonstress testing and contraction stress testing. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999;26:535-556.
4. Bernardes J, Costa-Pereira A, Ayres-do-Campos D, Van Geijn HP, Pereira-Leite L. Evaluation of interobserver agreement of cardiotocograms. *Int J Gynecol Obstet* 1997;57:33-37.
5. Anceschi MM, Piazze JJ, Ruozzi-Berretta A, Cosmi E, Cerekja A, Maranghi L, Cosmo EV. Validity of short term variation (STV) in detection of fetal acidemia. *J Perinat Med* 2003;31:231-236.
6. Bracero IA, Morgan S, Byrne DW. Comparison of visual and computerized interpretation of non-stress test results in a randomised controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1254-1258.
7. Dalton KJ, Dawson AJ, Gough NAJ. Long distance telemetry of fetal heart rate from patients own home using telephone networks. *Br Med J* 1983;286:1545.
8. Bernardes J, Moura ACF, Marques-de-Sa J, Pereira-Leite L, van Geijn HP. The Porto system. In: Van Geijn HP, Copray FA, eds. *A critical appraisal of fetal surveillance*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994:315-324.
9. Di Lieto A, Catalano D, Pontillo M, Pollio F, De Falco M, Iannotti F, Schiraldi P. Telecardiotocography in prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2001;7:119-120.
10. Di Lieto A, Giani U, Campanile M, De Falco M, Scaramellino M, Papa R. Prenatal telemedicine: clinical experience with conventional and computerized antepartum telecardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;103:114-118.
11. Di Lieto A, De Falco M, Campanile M, Papa R, Torok M, Scaramellino M, Pontillo M, Pollio F, Spánik G, Schiraldi P, Bibbò G. Four years' experience with antepartum cardiotocography using telemedicine. *J Telemed Telecare* 2006;12:228-233.
12. FIGO News: guidelines for fetal monitoring. *Int J Gynaecol Obstet* 1987;25:159-167.
13. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. *The use of electronic fetal monitoring. Evidence-based Clinical Guideline Number 8*. London: RCOG Press, 2001.
14. Bozúki Z. Chaos theory and power spectrum analysis in computerized cardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;71:163-168.
15. Weiner Z, Farmakides G, Schulamn H, Penny B. Central and peripheral hemodynamic changes in fetuses with AEDV in umbilical artery: correlation with computerized FHR pattern. *Br J Obstet Gynecol* 1996;103:541-546.
16. Arduini D, Valensise H. Cardiotocografia computerizzata: utilizzo clinico [Computerized cardiotocography: Clinical application]. In: Arduini D, Valensise H, eds. *Clinical cardiotocography*. [in Italian]. Rome: CIC Edizioni Internazionali, 2003:221-233.

## DI LIETO ET AL.

17. Marple L. *Digital spectral analysis with applications*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1971:264-265.
18. Peters CH, ten Broeke EDM, Andriessen B, Berendsen RCM, Wijn PFF, Guid Oei S. Beat-to-beat detection of fetal heart rate: Doppler ultrasound cardiocography compared to direct ECG cardiocography in time and frequency domain. *Physiol Meas* 2004;25:585-593.
19. Kobayashi H, Yoshida A, Kobayashi M, Hamada T, Noguchi Y, Yamada T. A new computerized analysis to precisely evaluate heart rate variability during the nonstress test. *Am J Perinatol* 2003;20:77-85.
20. Van Leeuwen P, Geue D, Lange S, Hatzmann W, Gronemeyer D. Changes in the frequency power spectrum of fetal heart rate in the course of pregnancy. *Prenat Diagn* 2003;23:909-916.
21. Dawes GS, Moulden M, Redman CWG. The advantages of computerised fetal heart rate analysis. *J Perinatol Med* 1991;19:19-45.
22. Vintzileos AM, Nochimson DJ, Guzman ER, Knuppel RA, Lake M, Schiffin BS. Intrapartum electronic fetal heart rate monitoring versus intermittent auscultation: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1995;85:149-155.
23. Alfirevic Z, Devane D, Gyte GM. Continuous cardiocography (CTG) as a form of electronic fetal monitoring (EFM) for fetal assessment during labour. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD006066.
24. Arsleri A, Pugliese A, Saporito M, Triassi M. *Rapporto sulla natalità in Campania 2003*. Naples: Poligrafica Ariello, 2005.
25. Ippolito A, De Falco M, Triassi M, Di Lieto A. A cost study of prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2003;9:288-291.

Address reprint requests to:  
Prof. Andrea Di Lieto  
Via Luca Giordano, 120  
80127 Naples, Italy

E-mail: dilieto@unina.it

Submitted: March 6, 2007  
Accepted: May 5, 2007

## PROGETTO TOCOMAT DI TELECARDIOTOCOGRAFIA CONVENZIONALE E COMPUTERIZZATA: BILANCIO DEI PRIMI CINQUE ANNI DI ATTIVITÀ

*Andrea Di Lieto<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione

**Scopo:** Analisi dei primi 5 anni d'attività del sistema TOCOMAT di telecardiotocografia convenzionale e computerizzata per il monitoraggio fetale antepartum. Il sistema connette la Centrale Operativa dell'Università "Federico II" di Napoli ad 8 unità periferiche dislocate in piccoli ospedali o consultori in aree periferiche o disagiate della Campania e ad una sede in Ungheria.

**Materiali e metodi:** I tracciati e i dati delle pazienti, trasmessi via modem alla centrale operativa, sono visualizzati e archiviati dal sistema OB Trace Vue, ed analizzati dal sistema 2CTG2, che effettua l'analisi computerizzata dei tracciati. I risultati di quest'ultima ed il referto medico sono inviati, in pochi minuti, via fax o e-mail all'unità periferica. I medici operanti presso la Centrale Operativa classificano i tracciati come "rassicuranti", "non rassicuranti" e "patologici" in accordo con le linee guida internazionali. L'outcome neonatale è stato valutato considerando il peso alla nascita, il punteggio di Apgar e la necessità di ricovero in terapia intensiva.

**Risultati:** In cinque anni, sono stati registrati 5830 tracciati, il 75% da pazienti ad alto rischio e il 25% da pazienti apparentemente a basso rischio. Il motivo principale per il monitoraggio delle pazienti ad alto rischio era il parto-pretermine. Nel gruppo ad alto rischio il 60.1% dei tracciati era "rassicurante", il 32.8% "non rassicurante" e il 7.1% "patologico". Nel gruppo a basso rischio il 79.4% dei tracciati era "rassicurante", il 16.3% "non rassicurante" e il 4.3% "patologico". Per ogni settimana di gestazione, i principali parametri dell'analisi computerizzata sono risultati nei limiti di normalità. L'outcome neonatale è stato complessivamente favorevole.

**Conclusioni:** La telecardiotocografia computerizzata consente una gestione più accurata delle gravide ad alto rischio, attraverso la maggiore efficienza dell'offerta sanitaria, il decentramento della sorveglianza ostetrica ed il miglioramento della qualità di vita delle pazienti residenti lontano da centri adeguatamente attrezzati. Inoltre, il sistema TOCOMAT consente il training continuo del personale sanitario. L'applicazione su larga scala del sistema TOCOMAT di telecardiotocografia computerizzata incrementa i vantaggi e l'efficienza del monitoraggio cardiotocografico tradizionale. Inoltre, il sistema consente di razionalizzare i costi per l'assistenza prenatale, riducendo sia il numero che la durata dei ricoveri ospedalieri non necessari per le gravide ad alto rischio.

**CORRELAZIONE TRA I PARAMETRI DELL'ANALISI COMPUTERIZZATA DI TRACCIATI CARDIOTOCOGRAFICI PATOLOGICI ED ESITO PERINATALE NELL'AMBITO DEL PROGETTO TOCOMAT DI TELECARDIOTOCOGRAFIA CONVENZIONALE E COMPUTERIZZATA**

*Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione

**Introduzione**

La cardiocografia è la tecnica attualmente più utilizzata nel terzo trimestre di gravidanza per il monitoraggio delle condizioni fetali prenatali ed in travaglio di parto. Praticamente tutte le gestanti a termine, prima del parto, si sottopongono ad almeno un tracciato cardiocografico (1-2).

L'analisi visuale del tracciato cardiocografico è gravata da grossa variabilità intra- ed interosservatori (3-4). L'analisi computerizzata consente un'interpretazione più obiettiva e riproducibile e la valutazione di parametri aggiuntivi, come la short term variability (STV), l'entropia approssimata e l'analisi spettrale che sembrano essere più specificamente correlati con uno stato di ipossia fetale (5).

La crescente richiesta di diffusione su larga scala di prestazioni sanitarie di livello specialistico ha dato impulso a molteplici attività connesse alla telemedicina in particolare la telemedicina prenatale che consente di prestare assistenza a distanza sia alle gestante che ai feti.

In Italia, il primo, e finora unico, network di telecardiocografia è costituito dal sistema "Tocomat", nato nel 2000 presso l'Unità di Medicina Prenatale del Dipartimento di Scienze Ostetrico, Ginecologiche e Urologiche dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" (6).

Il sistema Tocomat consente l'analisi computerizzata, fornita dal sistema 2CTG2, di tracciati cardiocografici convenzionali registrati presso otto unità periferiche situate in consultori o strutture ospedaliere decentrate (6-7).

Lo scopo di questo studio nato nell'ambito dell'attività del progetto TOCOMAT è valutare se, in tracciati considerati "patologici" all'analisi visuale, i valori di parametri alternativi, quali l'entropia approssimata e i contributi spettrali alle diverse frequenze, sono correlabili all'outcome perinatale.

**Materiali e metodi**

Abbiamo valutato l'ultimo tracciato cardiocografico registrato prima del parto e risultato patologico, da 64 pazienti monitorate durante l'anno 2005 nell'ambito dell'attività del sistema "Tocomat". I tracciati sono stati valutati dal personale della Centrale Operativa come "rassicuranti", "non rassicuranti" e "patologici" in base alla lettura visuale e al confronto con gli intervalli di confidenza forniti per ciascun parametro dall'International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) e dal Royal College of Obstetrician and Gynaecologists (8-9).

L'esito perinatale è stato considerato patologico quando era presente almeno una delle seguenti condizioni, prendendo come modello i criteri di Dunston-Boone (10):

- parto a < 32 settimane per compromissione fetale diagnosticata col tracciato CTG;
- trasferimento del neonato presso un reparto di terapia intensiva neonatale per di stress respiratorio a 36 settimane o più;
- indice di Apgar a 5' < a 7;
- nato morto;
- taglio cesareo d'emergenza con PH dell'arteria ombelicale < a 7.15 con evidenza di acidosi metabolica.

Sono stati registrati e memorizzati tutti i dati riguardanti le pazienti e l'esito del parto con i dati interessanti il neonato.

Sono stati presi in considerazione i diversi parametri forniti dal referto computerizzato del tracciato CTG ed in particolare: la frequenza cardiaca fetale (FHR), la variabilità a breve termine o "short term" (STV), la variabilità a lungo termine o "long term" (LTI), la variabilità delta ( $\Delta$ ), l'entropia approssimata (ApEn), i contributi spettrali alle diverse frequenze in particolare il contributo spettrale a bassa frequenza (LF), a media frequenza (MF) e ad alta frequenza (HF) nonché il rapporto  $LF/(HF + MF)$ . I parametri dell'analisi computerizzata sono stati valutati con riferimento ai percentili e alle curve di normalità proposti da Arduini et al (7) per ciascuna settimana di gestazione.

Per tutti i parametri considerati, i valori ottenuti nei feti con esito perinatale patologico sono stati confrontati con quelli dei feti con esito perinatale normale, utilizzando il test *t* di Student. La significatività statistica è stata posta per valori di  $p < 0.05$ .

### Risultati

Non tutte le pazienti erano gestanti a rischio. 20 neonati sono stati trasferiti presso un reparto di cura intensiva neonatale, 8 per basso peso e/o distress respiratorio, 6 per prematurità grave e distress respiratorio, 6 per altre problematiche alla nascita (soffio cardiaco, ipoglicemia...). 41 neonati sono risultati in buone condizioni, con pH dell'arteria ombelicale alla nascita  $> 7.15$ , nonostante l'ultimo tracciato registrato patologico. 3 neonati sono stati posti in incubatrice o sotto flusso libero di  $O_2$  senza poi dimostrare sequele particolari. Tranne che 5 parti spontanei fisiologici, il parto è stato espletato operativamente con taglio cesareo (Tab.I).

In 26 casi l'esito perinatale è risultato sfavorevole. Non ci sono stati casi di morte fetale, né di punteggio di Apgar a 5 minuti inferiore a 7. Tutti i 26 neonati con esito perinatale patologico sono risultati affetti da ritardo di accrescimento intrauterino (IUGR), con un peso medio alla nascita di  $2.519 \pm 1048,17$  ed un'età gestazionale media di 35 settimane e 6 giorni  $\pm 4$  settimane.

La FHR media è risultata nei range di normalità previsti, tranne che in 4 casi di franca tachicardia.

I dati riguardanti la STV sono illustrati nella tabella II. I valori del Delta (bpm) tranne che nei 5 casi (Tab.III) in cui il parto è stato espletato fisiologicamente ed in cui il Delta rientrava nella media per l'epoca gestazionale, sono sempre risultati superiori al 95° percentile, con un valore medio, indipendentemente dall'epoca gestazionale considerata, di  $29.56 \pm 9.75$  (DS) bpm.

Per quanto riguarda l'entropia (ApEn), i dati ottenuti sono risultati diversi in base all'epoca gestazionale considerata (Tab.IV). Per tutti i parametri suddetti, non sono state osservate differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) tra i feti con esito perinatale favorevole e quelli con esito negativo, nonostante l'analisi dei singoli parametri sia stata espletata su tracciati di base già patologici.

Anche i dati riguardanti i valori trovati per i contributi spettrali, classificati per settimana di gestazione non hanno dato una differenza statistica non significativa.

### Discussione

Il progetto Tocomat, con il decentramento della sorveglianza prenatale, ha permesso di estendere a molte pazienti un monitoraggio prenatale ultraspecialistico con la possibilità di offrire un'analisi computerizzata del tracciato anche laddove mancano mezzi adeguati ed è stato possibile, attraverso il continuo consulto e confronto col personale ultraspecializzato universitario, ottenere un training a distanza molto efficace del personale delle sedi periferiche.

Attraverso la raccolta e l'archiviazione dei dati è stato possibile registrare, valutare e confrontare i dati forniti dalla lettura computerizzata del tracciato CTG.

Col nostro studio abbiamo voluto valutare più approfonditamente alcuni parametri "non lineari" forniti dal sistema computerizzato quali l'entropia approssimata e i contributi spettrali di frequenza alle diverse intensità. Alcuni autori hanno dimostrato che l'ApEn può identificare i feti con IUGR e con valori di PH sull'arteria ombelicale alla nascita al di sotto di 7.20 (11-12).

Magenes et al. hanno dimostrato che l' ApEn subisce modificazioni significative nel senso di una diminuzione dopo stimolazione vibroacustica (VAS) attraverso una laringe artificiale, mentre l'STV aumenta(13). Altri hanno dimostrato che l'analisi spettrale della FCF può fornirci dati molto più precisi dell'analisi visuale sul predire il benessere fetale (14).

Nel nostro studio, in verità, non siamo riusciti ad ottenere risultati univoci; in particolare, non siamo riusciti ad individuare particolari differenze nei valori di ApEn e/o dei picchi di frequenza spettrale che risultassero distintive di situazioni fetali particolarmente a rischio, che poi, con l'espletamento del parto, hanno dato un esito perinatale negativo.

Rimane tuttavia un dato di fatto incontestabile: nell'ambito dell'analisi della frequenza cardiaca fetale sono stati fatti passi da gigante se si pensa che l'inizio veniva banalmente rappresentato dallo stetoscopio ostetrico; acquisizioni sempre più precise sono state raggiunte, nel campo della perinatalità prenatale, con l'uso del cardiocrogiografo prima e dell'introduzione dei sistemi computerizzati poi.

#### Bibliografia

1. Van Gejin HP. Development in CTG analysis. *Baill Clin Obstet Gynaecol* 1996; 10:185-207
2. Di Renzo GC, Copray FJA, O'Herlihy C, Van Gejin HP. Maternal-fetal surveillance within the European Community. In: Van Gejin HP, Copray FA, eds. *A critical appraisal of fetal surveillance*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994: 11-5
3. Devoe LD. Nonstress testing and contraction stress testing. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1999; 26(4): 535-56
4. Bernardes J, Costa-Pereira A, Ayres-do-Campos D, Van Gejin HP, Pereira-Leite L. Evaluation of interobserver agreement of cardiotocograms. *Int J Gynecol Obstet* 1997; 57: 33-7
5. Anceschi MM, Piazza JJ, Ruozi-Berretta A et al. Validity of short term variation (STV) in detection of fetal acidemia. *J Perinat Med* 2003; 31: 231-6
6. Di Lieto A, Catalano D, Pontillo M et al. Telecardiotocography in prenatal telemedicine. *J Telemed Telecare* 2001; 7: 119-20
7. Di Lieto A, Campanile M, De Falco M, Scaramellino M, Papa R. Prenatal telemedicine: clinical experience with conventional and computerised antepartum telecardiotocography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 103: 114-18
8. FIGO News: guidelines for fetal monitoring. *Int J Gynaecol Obstet* 1987; 25: 159-67
9. Royal College of Obstetricians Gynaecologists. The use of electronic fetal monitoring. Evidence-based Clinical Guidelines Number 8. London, RCOG Press, 2001
10. Dunston-Boone G, Kuhlman K, Kaufmann M. Correlation of fetal hearth rate decelerations following acoustic stimulation with perinatal outcome. *Am J Perinatol* 1995; 12: 342-46.
11. Magenes G, Signorini MG, Sassi R, Arduini D. Multiparametric analysis of fetal heart rate: comparison of neural and statistical classifiers.
12. Magenes G, Signorini MG, Arduini D, Cerutti S. Fetal Heart Rate Variability due to Vibroacoustic Stimulation: Linear and Nonlinear Contribution. *Methods Inf Med* 2004; 1: 47-51
13. Signorini MG, Ferrario M, Pedrinazzi L, Magenes G. Analysis of echographic and heart rate time and frequency domain parameters for the antepartum fetal surveillance. *Computers in Cardiology* 2005; 32: 679-82
14. Magenes M, Signorini MG, Arduini D, Cerutti S. Fetal hearth rate variabilità due to vibroacoustic stimulation: linear and non-linear contribution. *Methods Inf Med* 2004; 43: 47-51
15. Kobayashi H, Yoshida A, Kobayashi M, Hamada T, Noguchi Y, Yamada T. A new computerized analysis to precisely evaluate hearth rate variability during the nonstress test. *Am J Perinatol* 2003; 20(2): 77-85

TABELLA I. Tracciati valutati e caratteristiche dei neonati.

<b>Totale tracciati patologici valutati</b>	64
<b>Età gestazionale alla nascita (media ± DS)</b>	2.519 ± 1.048,17 gr
<b>Peso medio alla nascita (media ± DS)</b>	35w 6d ± 4w
<b>Parti per via vaginale</b>	5
<b>Interventi di taglio cesareo</b>	59

TABELLA II. Valori medi dell'STV e percentili di normalità per settimana gestazionale.

Percentili e curve di normalità dell'STV						
SETTIMANA DI GESTAZIONE	VALORE MEDIO STV	5°	10°	25°	50°	75°
27w*	3.24	-	-	-	-	-
28w*	3.72	-	-	-	-	-
29w*	3.73	-	-	-	-	-
30w*	3.36	-	-	-	-	-
31w	2.69	3.45	3.81	4.42	5.09	5.76
32w	3.50	3.62	4.26	5.31	6.48	7.65
33w	4.47	3.59	4.03	4.74	5.54	6.33
35w	3.31	3.90	4.45	5.35	6.35	7.35
36w	3.83	3.76	4.37	5.36	6.47	7.57
37w	3.49	2.74	3.56	4.90	6.40	7.89
38w	4.93	3.31	4.11	5.41	6.87	8.32
39w	4.17	2.87	3.75	5.18	6.79	8.39
40w	5.25	2.43	3.54	5.35	7.36	9.38
41w	5.40	2.40	3.31	4.80	6.46	8.12

TABELLA III. Valore del Delta (bpm) e percentili di normalità per settimana gestazionale

<b>Percentili e curve di normalità del Delta</b>						
<b>SETTIMANA DI GESTAZIONE</b>	<b>VALORE MEDIO <math>\Delta</math></b>	<b>25°</b>	<b>50°</b>	<b>75°</b>	<b>90°</b>	<b>95°</b>
<b>27w*</b>	<b>34.79</b>	-	-	-	-	-
<b>28w*</b>	<b>29.65</b>	-	-	-	-	-
<b>29w*</b>	<b>32.49</b>	-	-	-	-	-
<b>30w*</b>	<b>27.10</b>	-	-	-	-	-
<b>31w</b>	<b>19.26</b>	11.15	12.20	13.24	14.18	14.76
<b>32w</b>	<b>24.93</b>	12.60	13.97	15.35	16.58	17.34
<b>33w</b>	<b>32.29</b>	11.27	12.68	14.09	15.35	16.13
<b>35w</b>	<b>19.68</b>	12.02	13.66	15.30	16.77	17.67
<b>36w</b>	<b>25.56</b>	11.94	13.79	15.64	17.30	18.32
<b>37w</b>	<b>33.75</b>	12.15	13.91	15.68	17.26	18.23
<b>38w</b>	<b>35.83</b>	11.73	13.71	15.70	17.48	18.57
<b>39w</b>	<b>27.49</b>	11.60	13.61	15.61	17.40	18.50
<b>40w</b>	<b>39.98</b>	11.61	14.08	16.54	18.75	20.11
<b>41w</b>	<b>39.99</b>	10.71	12.74	14.77	16.58	17.70

TABELLA IV. Valori medi dell'Entropia Approssimata e percentili di normalità per settimana di gestazione.

SETTIMANA DI GESTAZIONE	VALORE MEDIO DELL'ApEn	VALORI DI RIFERIMENTO DELL'ApEn	
		50° percentile	95° percentile
27w*	1.04	-	-
28w*	1.00	-	-
29w*	1.15	-	-
30w*	1.21	-	-
31w*	1.39	-	-
32w	1.52	1.20	1.37
33w	1.62	1.30	1.52
35w	1.55	1.29	1.47
36w	1.38	1.26	1.54
37w	1.35	1.27	1.47
38w	1.36	1.21	1.24
39w	1.45	1.19	1.29
40w	1.16	1.30	1.51
41w	1.17	1.36	1.50

**LA TELEMEDICINA PRENATALE: TELECARDIOTOCOGRAFIA CONVENZIONALE E COMPUTERIZZATA***Andrea Di Lieto, Marta Campanile, Marianna De Falco*

Nella maggior parte dei Paesi industrializzati, praticamente tutte le gravide a termine, soprattutto con gravidanza a rischio, si sottopongono ad almeno un esame cardiocografico. Il frequente ricorso al monitoraggio cardiocografico in caso di gravidanza ad alto rischio comporta spesso il frequente allontanamento della paziente dal proprio ambiente familiare. Tale evenienza è stressante soprattutto per le pazienti che vivono in luoghi decentrati, lontano da strutture sanitarie adeguatamente attrezzate. Inoltre, la necessità di monitoraggio cardiocografico intensivo in caso di gravidanza a rischio spesso comporta ricoveri ospedalieri prolungati, incrementando, oltre al disagio per la paziente ed i suoi familiari, anche la spesa sanitaria.

La telemedicina prenatale è una nuova scienza biomedica basata sull'integrazione di tecnologie informatiche, apparecchiature elettromedicali e sistemi di telecomunicazione finalizzata all'assistenza a distanza sia alla gestante che al feto. Anche la cardiocografia può avvalersi delle innovazioni tecnologiche della telemedicina. La cardiocografia convenzionale, che prevede una lettura visiva da parte del medico, presenta alcuni limiti, quali l'elevata percentuale di falsi positivi, frequentemente causa di "overtreatment", e la soggettività dell'interpretazione, con elevata variabilità interosservatori ed intraosservatore, tali limiti sono stati in parte superati dall'introduzione sul mercato di software per l'analisi computerizzata del tracciato cardiocografico. L'uso di tali sistemi ha migliorato l'accuratezza e la ripetibilità dell'esame ed ha consentito di ridurre la durata del monitoraggio ed il numero di eventuali test aggiuntivi per la conferma del benessere fetale, nonché la necessità di ricovero in unità di terapia intensiva neonatale. Infatti, l'analisi computerizzata consente di valutare parametri come "short term variability" (STV) e l'entropia approssimata (ApEn), con più elevato potere predittivo della sofferenza fetale ipossica e non definibili con la lettura convenzionale.

L'analisi computerizzata, presso centri di riferimento di terzo livello, di tracciati cardiocografici registrati con modalità convenzionale presso unità operative periferiche dislocate generalmente in aree geografiche decentrate, rappresenta una delle applicazioni più attuali della telemedicina prenatale. Essa, rendendo facilmente disponibili sofisticate e costose apparecchiature per l'analisi computerizzata a pazienti e a centri sanitari che altrimenti non potrebbero accedervi, rende possibile un effettivo innalzamento del livello di assistenza alla gravida a rischio che necessita di monitoraggio fetale intensivo, nonché il miglioramento della qualità di vita della gestante ed una razionalizzazione della spesa sanitaria.

Un buon impulso alla diffusione della telecardiocografia computerizzata in Campania è stato dato, nel 2000, dal primo progetto italiano di telemedicina prenatale "TOCOMAT P.O.P. 98". Attualmente, il sistema TOCOMAT opera in tre fasi: un'unità periferica (consultorio o ospedale), dotata di cardiocografo tradizionale con interfaccia modem, registra, memorizza e trasmette in 40-60 secondi i tracciati e le informazioni cliniche relative alla paziente alla centrale operativa via modem, utilizzando una normale linea telefonica; la centrale operativa, ubicata presso l'unità di Medicina dell'Età prenatale dell'Università "Federico II", acquisisce, visualizza ed archivia il tracciato e le relative informazioni cliniche attraverso un server (OB TraceVue) e trasmette i dati al sistema 2CTG2 per l'analisi computerizzata; il risultato dell'analisi computerizzata ed il referto medico sono inviati via internet, entro pochi minuti, all'unità periferica. Attualmente, sono parte del sistema TOCOMAT otto unità periferiche regionali. Inoltre, dal 2004 è stata attivata un'unità periferica ungherese, sita presso la "Semmelweis University" di Budapest. Dal 2001 ad oggi, sono stati analizzati 7728 tracciati cardiocografici nell'ambito del sistema TOCOMAT, ottenuti per il 75% da gravide ad alto rischio e per il 25% da gravide apparentemente non a rischio, inizialmente incluse nel progetto per favorire il training del personale e per testare le apparecchiature. La minaccia di parto pretermine è risultata la più frequente indicazione al monitoraggio

cardiotocografico antepartum. In media, ciascuna paziente a basso rischio si è sottoposta a 2.75 tracciati, ciascuna paziente ad alto rischio a 3.25 tracciati. Non sono stati osservati risultati falsi negativi. Per ogni settimana di gravidanza, il valore medio dei parametri analizzati dal sistema 2CTG2 è risultato nell'ambito dei range di normalità forniti da Arduini et al. La percentuale di tagli cesarei effettuati sulle pazienti monitorate è risultata del 50.8%. L'outcome neonatale è stato complessivamente favorevole. L'interazione tra gli operatori delle unità periferiche e lo staff di esperti della centrale operativa universitaria consente anche l'attuazione di un training professionale, in ottemperanza alle attuali esigenze di aggiornamento continuo in medicina. Inoltre, l'estensione del progetto su larga scala, anche all'estero, consente di esportare le applicazioni tecnologiche e le abilità professionali richieste per l'attuazione di un programma di telemedicina prenatale ad aree geografiche in cui esse sono carenti, migliorando la qualità dell'assistenza perinatale offerta ad un ampio bacino di utenza. Ciò pone le basi per la costituzione di nuove centrali operative collegate per via telematica a nuove reti di telemedicina prenatale.

In futuro, la telemedicina prenatale potrà favorire la formazione di una grande rete telematica, anche satellitare, con una dotazione periferica di apparecchiature ubicate, oltre che in consultori ed ospedali di aree decentrate, su navi, aerei, autoambulanze, idroambulanze ed anche presso il domicilio delle gestanti. La centrale operativa universitaria, inoltre, potrebbe essere collegata al 118 regionale in modo da effettuare con maggiore efficienza, in seguito a controlli consultoriali o domiciliari, un ricovero ospedaliero d'urgenza.

**PROGETTO TOCOMAT DI TELECARDIOTOCOGRAFIA CONVENZIONALE E COMPUTERIZZATA: ANALISI DEI PRIMI SEI ANNI DI ATTIVITÀ**

*Andrea Di Lieto<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Marta Campanile<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Filippo Castaldo<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione

**Scopo:** Analisi dei primi 6 anni di attività del sistema TOCOMAT di telecardiotocografia convenzionale e computerizzata per il monitoraggio fetale antepartum. Il sistema connette la Centrale Operativa dell'Università "Federico II" di Napoli ad 8 unità remote dislocate in piccoli ospedali o consultori in aree decentrate della Campania e ad una sede in Ungheria (1,2).

**Materiali e metodi:** I tracciati e i dati delle pazienti, trasmessi via modem alla centrale operativa, sono visualizzati e archiviati dal sistema OB Trace Vue, ed analizzati dal sistema 2CTG2, che effettua l'analisi computerizzata dei tracciati. I risultati di quest'ultima ed il referto medico sono inviati, in pochi minuti, via fax o e-mail all'unità periferica. I medici operanti presso la Centrale Operativa classificano i tracciati come "rassicuranti", "non rassicuranti" e "patologici" in accordo con le linee guida internazionali. L'outcome neonatale è stato valutato considerando il peso alla nascita, il punteggio di Apgar e la necessità di ricovero in terapia intensiva.

**Risultati:** In sei anni, sono stati registrati 7728 tracciati, il 75% da pazienti ad alto rischio e il 25% da pazienti apparentemente a basso rischio. Il motivo principale per il monitoraggio delle pazienti ad alto rischio era il parto-pretermine. Per ogni settimana di gestazione, i principali parametri dell'analisi computerizzata sono risultati nei limiti di normalità. L'outcome neonatale è stato complessivamente favorevole.

**Conclusioni:** La telecardiotocografia computerizzata consente una gestione più accurata delle gravide ad alto rischio, attraverso la maggiore efficienza dell'offerta sanitaria, il decentramento della sorveglianza ostetrica ed il miglioramento della qualità di vita delle pazienti residenti lontano da centri adeguatamente attrezzati. Inoltre, il sistema TOCOMAT consente il training continuo del personale sanitario. L'applicazione su larga scala del sistema TOCOMAT di telecardiotocografia computerizzata incrementa i vantaggi e l'efficienza del monitoraggio cardiocografico tradizionale. Inoltre, il sistema consente di razionalizzare i costi per l'assistenza prenatale, riducendo sia il numero che la durata dei ricoveri ospedalieri non necessari per le gravide ad alto rischio.

**Bibliografia**

- 1) Di Lieto A., Giani U., Campanile M., De Falco M., Scaramellino M., Papa R. Conventional and computerized antepartum telecardiotocography. Experienced and inexperienced observers versus computerized analysis. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;55(1):37-40.
- 2) Di Lieto A., De Falco M., Campanile M. et al. Four years' experience with antepartum cardiotocography using telemedicine. *J. Telemed. Telecare* 2006;12(5):228-33.

concentrations of all amniotic fluids are analyzed with radioimmunoassay.

Results: Amniotic fluid leptin levels did not show any significant difference between amniotic fluids of normal and trisomy 21 fetuses ( $p=0,051$ ). Median level of leptin was 10,06 ng/ml (range 2,10-36,69) for trisomy 21 fetuses and 14,53 ng/ml (range 2,30-67,33) for normal fetuses.

Conclusion: Leptin did not show any significant difference in second trimester amniotic fluids of fetuses with trisomy 21 and normal fetuses as a marker of angiogenesis. Thus its use may not help down syndrome screening.

Keywords: Leptin, amniotic fluid, trisomy 21

#### EARLY-ONSET SEPSIS IN MULTIPLE AND SINGLETON GESTATIONS.

Deutsch Alice, Brasil Tatiana, Kawagoe Julia, Dornaus Maria Fernanda, Correa Luci, Abramovici Sulim.

Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

Introduction: Early-onset sepsis (EOS) is responsible for high morbimortality in the newborn. The incidence in multiple gestations is not clear.

Objective: To determine the incidence and to identify the pathogens responsible for bacterial EOS in infants born from multiple and singleton gestation.

Aim and Material: Retrospective study (from January/2001-July/2006) based on infants' charts with clinical/laboratorial diagnosis of early-onset sepsis established by Hospital Infection Control Committee and based on Rodwell et al. (1988) criteria. The following data were analyzed: a) Maternal: mode of delivery, prolonged rupture of membranes, fever or urinary infection and multiple or singleton gestation; b) Neonates: birth weight, gestational age, neutrophil count, C-reactive protein and blood culture. Chi-Square; significance:  $p < 0,05$ .

Results: 16,417 infants were born (91,7% singleton and 8,3% multiple). The incidence of EOS was 4 cases for 1000 live births and it was 5 times more frequent in multiple newborns 20/1337 (1,47%) than in singleton 48/15012 (0,48%);  $p < 0,01$ . However, when prematurity was taken into account there was no difference between multiple 20/997 (2%);  $p = 0,61$  and singleton 27/1188 (2,2%). Blood culture was positive in 20,5% and group B Streptococcus (GBS) was the most common agent (57%), followed by Staphylococcus sp. and Escherichia coli.

Conclusions: Multiple gestation is a risk factor for early sepsis due to prematurity. Maternal screening for GBS before 35 weeks' gestational age in multiple pregnancies must be considered.

Keywords: Sepsis, multiple gestation, prematurity

#### THE IMPACT OF MULTIPLE BIRTH IN THE PREMATURITY, LOW BIRTH WEIGHT AND NEONATAL MORTALITY RATES IN A TERTIARY NEONATAL CARE UNIT IN SÃO PAULO-BRAZIL.

Deutsch Alice MD, Brock Romy S. MD, Abramovici Sulim, MD

\*Hospital Israelita Albert Einstein- São Paulo- Brazil

Introduction: The increase in multiple births rates due to the development of artificial reproductive technologies has been associated to greater risks of prematurity and low birth weight (LBW).

Aim/ Material: To evaluate the impact of multiple births on prematurity and LBW rates and to examine the effect of this impact on neonatal mortality comparing singletons and multiple births. It was included all live births from 2001 to 2004 and compared the birth weight (BW) and gestational age (GA) between the singleton and multiples, and the mortality rates between the both groups in general and stratified by GA (A: 24-25 6/7, B: 26-27 6/7, C: 28-29 6/7 weeks) and BW (a: 500-749, b: 750-999, c: 1000-1249, d: 1250-1499g).

Results: 11375 infants were included, 91,8% singletons and 8,2% multiples. The mean and standard deviation (SD) of the GA were 38,1 ( $\pm 1,9$ ), 35,1 ( $\pm 3,4$ ), 32,0 ( $\pm 2,3$ ) and 30,1 ( $\pm 3,5$ ) weeks for singleton, twins, triplets and quadruplets, respectively ( $p < 0,001$ ). The BW mean and SD were 3124g ( $\pm 818,0$ ), 2283,4g ( $\pm 529,3$ ), 1612,5g ( $\pm 517,9$ ) and 1270,0g ( $\pm 498,0$ ) for singletons, twins, triplets and quadruplets respectively ( $p < 0,001$ ). The mortality rate for singleton infants was 1,5/1000, and 21,3/1000 for the multiple infants ( $p < 0,0001$ ). However, when the GA and BW stratifications were performed, the mortality rate difference between the singleton and multiple births groups was not statistically significant.

Conclusion: Our data emphasizes that the rise in multiple births contributes to the increase in prematurity and low birth weight rates, which represent an important determinant of neonatal mortality in these infants.

Keywords: multiple birth, prematurity, low birth weight, infant newborn, mortality

#### CARE TO RELIEVE PAIN-STRESS IN PRETERM NEWBORNS

Caterina Di Gioia, Roberta Bracceschi, Cristiana Copioli, Francesco Pisani, Emanuela Turco, Paola Ziliani, Giulio Bevilacqua

Child Neuropsychiatric Department, Neonatology Department, University of PARMA, Italy

A variety of non-pharmacological pain-prevention and relief techniques have been studied to evaluate reduction of the pain in neonates. The aim of our study was to compare the analgesic effect of sucking a pacifier with the use of local anaesthetic cream (EMLA) during venipuncture in preterm newborns, using physiological and behavioural as indicators of pain stress. We analysed the newborns' reaction to invasive procedures such as blood draws in 17 preterm newborns. Our patients underwent repeated vein draws without pain relief (control group), sucking a pacifier, after the application of EMLA; we also evaluated a group of patients when the nurses approached them for care without pricking. For each infant we recorded the average values of the physiological parameters (heart rate, oxygen saturation and respiratory rate) at rest and after pain stimuli, behavioural states (crying or grimaces similar to crying), number and total minutes required for blood draw. The maximum heart rate values, respiratory rate and the maximum respiratory rate values presented a statistically difference only between subjects that underwent vein draws compared to subjects without pricking ( $p < 0,01$ ). Moreover, the SpO2 parameter presented a significant increase in the control group compared to the others ( $p = 0,024$ ). Analysis of the behavioural parameters shows that crying seems significantly related to number of punctures and length of time needed for blood sampling ( $p = 0,000$ ). It is clear that pain stress is more closely related to the duration and number of venipuncture than pain relief methods. Our results suggest that limiting the number and duration of vein draws could help to reduce pain stress in preterm newborns.

Keywords: Pain, Stress, EMLA Best regards, WCPM8 Conference Secretariat

#### REGIONAL AND INTERNATIONAL PRENATAL TELEMEDICINE NETWORK FOR COMPUTERIZED ANTEPARTUM CARDIOTOCOGRAPHY.

A. Di Lieto 1, M. De Falco 1, M. Campanile 1, M. Török 2, S. Gábor 2, M. Scaramellino 1, P. Schiraldi 1, F. Ciociola 1

1 Prenatal Care Unit, Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine - University "Federico II" of Naples, Italy

2 Department of Obstetrics and Gynaecology, National Health Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Objective: To review the activity of TOCOMAT, a system for antepartum cardiotocographic (CTG) telemonitoring.

**Materials and Methods:** Nine peripheral units recorded the traces, sent them via modem to the University operation centre, where the computerised analysis was performed, and received the medical report within few minutes, via fax or e-mail. Traces were classified as "reassuring", "non reassuring" or "pathological". The parameters of computerized analysis were grouped together for each week of gestation. The perinatal outcome was also evaluated.

**Results:** In five years, 5830 traces were analyzed, 4372 (75%) from 1344 high risk patients and 1458 (25%) from 529 patients at apparent low risk. The system allowed the identification of high risk patients (32.8% with non-reassuring traces and 7.1% with pathologic traces) and low risk patients (16.3% with non-reassuring traces and 4.3% with pathologic traces) that required further evaluation. The neonatal outcome was overall good. At each week of pregnancy, the mean values of computerized parameters resulted into the normal ranges.

**Conclusion:** The TOCOMAT system allowed a decentralization of prenatal surveillance and improved the patients' quality of life and the level of prenatal care.

**Keywords:** telemedicine; telehealth; distance learning

#### CLINICAL AND SERUM SCREENING CHARACTERISTICS OF WOMEN DONATING BREAST MILK FROM UNIVERSITY HOSPITAL'S MILK BANK

E. M. A. Diniz; V. S. Quintal; G. Velloni; S. M. Ibidi; F.A.C.Vaz.  
University Hospital of the University of São Paulo (UH-USP), Brazil.

**Background:** Through the work of incentive for breastfeeding, it is possible to operate the excess of donor's milk production with the intention to attend to newborns, specially the very low-birth-weight infant. **Objective:** To describe the clinical characterization and the serum screening of the milk bank's donors of the UH-USP. **Methods:** We describe a retrospective study related to 864 mothers to donation of milk between August, 1999 and July, 2005. The dates were obtained from a questionnaire, approved from Brazilian National Network of Human Milk Banks, with the following findings: age, marital status, number of pregnancies, antenatal consultations, medical history, gestational age and birthweight of the newborn. **Criterion of inclusion:** The mother's intention to donate the milk, and **Criterion of exclusion:** Not agree with the exams and/or not answer to the questionnaire. **Results:** Among the 864 mothers, 494(57,17%) were married; 363(42%) were single; 5(0,6%) were divorced and 2(0,23%) were widow. The average profile of the mothers was: age: 24,6 years old; prenatal: 7,64 times; number of pregnancies:1,92; gestational age: 38,47 weeks; birthweight 3063,61g. Related to the incidence of infectious diseases: 718 (83,1%) donors were negative and 146 (16,9%) were positive to the following micro-organisms: Hepatitis B: 127 (86,98%), with 96 (75,6%) immune to the virus; Hepatitis C: 3 (2,05%); Chagas disease: 3 (2,05%) and Human T-lymphoma Virus (HTLV-I and HTLV-II): 1 (0,68%). One of the mothers was positive to both Hepatitis B and C. **Conclusion:** The authors established that most part of the donors were healthy and young. There were detected positive serum screening to micro-organisms that constitute contraindication to human milk donation, suggesting the need of a prior serum screening of the donors to the milk bank.

**Keywords:** Milk Bank; serology, infectious diseases.

#### INDUCTION OF LABOUR: ADVANTAGES AND RISKS WITH LOCAL PROSTAGLANDINS

C. Di Renzo M. Romanelli, E. Ribiani, L. Cruciani, F. Incalza, L. Burnelli, S. Gerli, G  
Department of Obstetrics and Gynecology, Centre of Perinatal and Reproductive Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy.

Induction of labour is a very common practice in modern obstetrics. The most used method is the one based on the use of topical prostaglandins.

**AIM:** In this study we aimed to analyse the result of pharmacological induction of labour through the use of dinoprostone, comparing the intracervical gel (Prepidil 0,5 mg) and the vaginal insert (Proress 10 mg).

**Methods:** an observational longitudinal study was conducted, in which all patients treated with prostaglandins from January 1<sup>st</sup> 2003 to June 30<sup>th</sup> 2006 were included, for a total of 852 cases. The intracervical gel was applied on 32,5% of expectants (277 patients) while the vaginal insert to 56,2% (479 patients); in 11,3% of the cases (96 patients) both preparations were administered, one after the other.

**Results:** In two thirds out of the total (568 patients), the induction led to the achievement of vaginal delivery, in contrast to 284 cases in which the practice had negative results: in 270 women (31,7%) a caesarean section was performed. Adverse events were detected only in 2,4% of cases (22 patients); the most frequent adverse reaction was uterine hypertonus in 0,8% of cases.

**Conclusion:** Induction through prostaglandins is an effective method to get cervical ripening. Its success is influenced by Bishop score. In the case of unfavourable cervix, vaginal insert seems to get better results than intracervical gel. The relation between risks and benefits is certainly better in the latter.

**Keywords:** Cervical ripening - Dinoprostone - Intracervical gel - Intravaginal insert - Bishop score - Vaginal delivery - Caesarean section - Uterine hyperstimulation-Neonatal outcome

#### PREGNANCY IN A RUDIMENTARY HORN OF UTERUS-CASE REPORT

B. Divic M.D. D. Malobabic M.D. S. Arbanas M.D.

**Introduction:** Pregnancy in a rudimentary horn of uterus is a rare form of ectopic pregnancy described up to now in more than 350 cases. First case recognized in a XVIII century. Pathogenesis of the ectopic pregnancy in a rudimentary horn is presented through the migration of spermatozoa over the coule de sac into the fallopian tube which ended in the rudimentary horn where the conception and implantation took place. Clinical signes which indicates the pregnancy show themselves later, but they do not differ much from the signes of normal implantation. Later on usually in a second trimester pains in a lower parts of abdomen start with a scarce vaginal blood loss. Soon rupture of the rudimentary horn occurs with massive life threatening haemorrhage. Therapy consists of the surgical resection of the rudimentary horn which we performed in our case.

**Case report:** We presented a case of 31 years old lady with previously diagnosed normal intrauterine pregnancy XVII weeks old. She was admitted at the hospital as an emergency with sudden onset left sided lower abdominal pain and diffuse tenderness of the abdomen-defense musculair at the vaginal examination. Transabdominal U.S. scan revealed gestation sac which measurement was in accordance to amenorrhoea. There was a lot of free liquid in the abdomen which was considered as blood. Vital functions were worsening and the emergency laparotomy was performed. In the abdominal cavity we found a vital fetus inside the gestational sac floating with the umbilical cord and the placenta fixed to the rupted left rudimentary horn of uterus and the abundant haemorrhagia from a damaged vessels. Right fallopian tube and right ovary were normal. The rudimentary horn of the uterus with the left sided fallopian tube were resected. Blood loss was compensated and the post-op course was uneventful. The patient was discharged home the sixth post-op day.

**Conclusion:** Rupture of the rudimentary horn of uterus should be considered in the differential diagnosis of the acute onset of the lower abdominal pain following haemorrhagic shock and an emergency laparotomy proved to be life saving for the patient.

**Introduction :** Placenta accreta is an abnormal adherence of the placenta to the uterine wall and may complicate the third stage of labour by severe uterine haemorrhage. Hysterectomy has long been the primary treatment. Recently, conservative treatment has been proposed to be an alternative to decrease morbidity. The aim of this study was to compare morbidity of different conservative treatment of placenta accreta.

**Materials and methods :** A retrospective study of medical charts to identify all patients with placenta accreta was conducted at two tertiary maternity wards of Marseille, France. The study included all patients diagnosed during the period from January 1993 to August 2007. Information on subsequent gynaecological events was obtained from records of follow-up consultations.

**Results :** During this 14-year period, 73 cases of placenta accreta were recorded among 59 900 deliveries. Incidence of placenta accreta was about 1/821. Ten patients had standard management with a primary hysterectomy. A subgroup of 63 patients was treated conservatively. Twenty-five patients received additional treatment by arterial ligation and 14 by embolisation. A portion and the entire placenta was left in situ in 20 cases of 25 arterial ligation and in all cases of embolisation. Conservative treatment failed in 11 cases and led to hysterectomy. The procedure was arterial ligation in 6 cases and embolisation in 3 cases. This three cases were directly related to complications of the embolisation procedure. There was one maternal death after arterial ligation. There was no statistically significant difference in term of morbidity between the two groups. The rates of transfusion were comparable but the quantity of blood and plasma transfused was superior in case of arterial ligation. The rate of septicemia was superior in case of embolisation but it was not significant.

**Discussion :** The incidence of placenta accreta has dramatically increased in recent years, due to the increasing caesarean rates in most countries. Our study is the largest to date and reports the results of conservative management of placenta accreta. This procedure permit the decrease of the maternal morbidity compared with the radical treatment. Because there was no statistically significant difference in term of morbidity between arterial ligation and embolisation, the choice was made individual. Furthermore, conservative treatment was successful in the majority of cases.

242

### Temporary occlusion of the internal iliac arteries for intraoperative bleeding control during cesarean-hysterectomy for placenta percreta

Fernanda G C Surita, Marcelo L Nomura, Carlos Eduardo Godoy Jr, Priscila S Marshall, Samira M T Haddad, Renato Passini Jr

University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

**Introduction:** Uterine bleeding due to placenta accreta is one of the main causes of maternal hemorrhage and death. Placenta percreta is the most severe form of abnormal placental adherence and it is characterized by deep myometrial invasion, with no cleavage plan for detachment. It can also invade adjacent organs, specially urinary bladder. Several methods for bleeding control during cesarean delivery have been described and temporary balloon occlusion of the iliac arteries (TBOIA) seems to have some advantages over other techniques.

**Methods:** Two cases reported in which TBOIA was used for bleeding control for cesarean delivery near term. After peridural anaesthesia, both femoral arteries were catheterized and balloon catheters were placed in the internal iliac arteries. A corporal uterine incision was made and fetal extraction was accomplished, with the placenta left in situ. After that, both balloons were inflated and total hysterectomy was performed, with deflation of the balloons after uterine extraction.

**Results:** Case 1- 20 year-old, two previous cesarean sections, ultrasonographic diagnosis made at 33 weeks, cesarean at 35 weeks, newborn weighed 2500 grams, total blood loss 1200 ml, surgical time 4 hours 50 minutes. Case 2- 39 years-old, three previous cesarean sections, diagnosis made at 23 weeks, cesarean at 36 weeks, newborn weighed 2525 grams, total blood loss 1100 ml, surgical time 5 hours. None of the patients needed blood transfusions.

**Discussion:** Precise diagnosis and elective delivery with an experienced team are essential features for reduction of maternal mortality and morbidity associated with placenta accreta. TBOIA is a therapeutic option associated with better maternal outcomes and a low rate of complications.

523

### Regional and international prenatal telemedicine network for computerized antepartum cardiotocography.

A. Di Lieto<sup>1</sup>, M. De Falco<sup>1</sup>, M. Campanile<sup>1</sup>, P. Schiraldi<sup>1</sup>, F. Carbone<sup>1</sup>, A. Busiello<sup>1</sup>, F. Ciociola<sup>1</sup>, M.A. Di Nardo<sup>1</sup>, R. Votino<sup>1</sup>, M. Török<sup>2</sup>, S. Gábor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Prenatal Care Unit, Department of Obstetrical-Gynaecological and Urological Science and Reproductive Medicine -University "Federico II", Italy, <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, National Health Center, Semmelweis University, Hungary

**Objective:** To review the activity of TOCOMAT, a system for antepartum cardiotocographic (CTG) telemonitoring.

**Materials and Methods:** Nine peripheral units recorded the traces, sent them via modem to the University

operation centre, where the computerised analysis was performed, and received the medical report within few minutes, via fax or e-mail. Traces were classified as "reassuring", "non reassuring" or "pathological". The parameters of computerized analysis were grouped together for each week of gestation. The perinatal outcome was also evaluated.

**Results:** In five years, 5830 traces were analyzed, 4372 (75%) from 1344 high risk patients and 1458 (25%) from 529 patients at apparent low risk. The system allowed the identification of high risk patients (32.8%

with non-reassuring traces and 7.1% with pathologic traces) and low risk patients (16.3% with non-reassuring traces and 4.3% with pathologic traces) that required further evaluation. The neonatal outcome was overall good. At each week of pregnancy, the mean values of computerized parameters resulted into the normal ranges.

**Conclusion:** The TOCOMAT system allowed a decentralization of prenatal surveillance and improved the patients' quality of life and the level of prenatal care.

**Key words:** telemedicine; telehealth; distance learning.

## OBSTETRICS III

168

### In Utero Progression of Ventriculomegaly: Bilateral vs. Unilateral

Gowrishankar Paramasivam, Mellisa Damodaram, Lisa Story, Sailesh Kumar  
Queen Charlotte's and Chelsea Hospital, London, United Kingdom

**Introduction:** Mild ventriculomegaly occurs bilaterally at an incidence of 0.15% - 0.7% of fetuses, and unilaterally in 0.07% of fetuses. Up to 40% of these cases resolve, however, the natural history of bilateral ventriculomegaly is unclear, in terms of whether it differs from unilateral ventriculomegaly. Our objective was to compare the progression of bilateral and unilateral ventriculomegaly.

**Methods:** The ultrasound obstetric database of our hospital was searched for all cases of isolated ventriculomegaly from 2000 and 2007. Cases with CNS and other structural abnormalities were excluded. Cases with only one ultrasonographic examination were excluded.

**Results:** 51 cases of isolated bilateral ventriculomegaly and 38 cases of unilateral ventriculomegaly were identified. 1 fetus with bilateral ventriculomegaly had severe ventriculomegaly >15mm. 37% of cases of bilateral ventriculomegaly resolved in comparison to 53% of cases of unilateral ventriculomegaly ( $p = NS$ ). The left ventricular size was  $11.5 \pm 1.3$ mm if ventriculomegaly was bilateral, and  $11.2 \pm 1.3$ mm if it was unilateral. Right ventricular size was  $11.4 \pm 1.3$ mm if ventriculomegaly was bilateral, and  $10.9 \pm 0.9$ mm if it was unilateral ( $p = NS$ ). The left ventricle regressed at  $-0.06$ mm/week if the ventriculomegaly was bilateral, and progressed at  $0.07$ mm/week if it was unilateral. The right ventricle regressed at  $-0.07$ mm/week if the ventriculomegaly was bilateral, and at a rate of  $-0.47$  mm/week if it was unilateral ( $p < 0.05$ ). There was no significant association of either maternal age, or fetal gestation at presentation with the incidence of bilateral versus unilateral ventriculomegaly.

**Conclusion:** Our results indicate that cases of bilateral ventriculomegaly are less likely to resolve compared with unilateral ventriculomegaly. The rate of regression of right sided ventriculomegaly in particular was significantly increased if the condition was unilateral. This may imply different etiologies for cases of unilateral and bilateral ventriculomegaly and warrants further investigation.

174

### Fetal Ovarian Cysts: Prenatal Diagnosis And Pos-Natal Follow-Up. An Eleven Years Review

Gisela Fornelos<sup>1</sup>, Ana Luisa Montes<sup>1</sup>, Leonor Ferraz<sup>3</sup>, José Pinho de Sousa<sup>2</sup>, Francisco Valente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology Department - Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho - EPE., Vila Nova de Gaia, Portugal, <sup>2</sup>Pediatric Surgery Department - Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho, EPE., Vila Nova de Gaia, Portugal, <sup>3</sup>Neonatology Department - Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia / Espinho, EPE., Vila Nova de Gaia, Portugal

**Introduction:** Ovarian cysts are the most frequent, prenatally diagnosed intra-abdominal cysts.

In this review the authors evaluate the outcome of fetal ovarian cysts in relation to their sonographic parameters (appearance and size) and prenatal and postnatal course, especially with regard to the need for surgical intervention.

**Methods:** Retrospective analysis of all cases of fetal ovarian cyst observed in our institution since 1<sup>st</sup> January 1996 until 31<sup>st</sup> December 2006. The pre- and postnatal data of 16 newborn that were suspected prenatally to have an ovarian cyst were analyzed. The postnatal outcome was known for 15 of the children.

**Results:** The diagnosis was made in all cases in the third trimester (median, 32; range, 26-37 weeks' gesta-

## SINDROME ERITROCITOSO-FIBROMATOSICA: RUOLO PATOGENETICO DELL'ERITROPOIETINA E DEL SUO RECETTORE NEI MIOMI GIGANTI

*Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Paola Schiraldi<sup>1</sup>, Mariangela Scaramellino<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione, <sup>2</sup>Università degli Studi di Napoli "Federico II" – Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali

### Introduzione

La sindrome eritrocitoso-fibromatosa è caratterizzata dalla coesistenza di miomi, quasi esclusivamente di grandi dimensioni, ed eritrocitosi, che regredisce dopo l'asportazione del mioma [1,2,3].

L'eziopatogenesi di questa condizione non è ben nota, ma sono state formulate diverse ipotesi. In particolare, recenti studi confermano la produzione di eritropoietina (Epo) da parte del mioma [4,5,6].

L'Epo, fisiologicamente, attiva l'eritropoiesi, stimolando la proliferazione e la differenziazione dei precursori eritroidi [7,8,9]. Tale ormone estrinseca la propria attività legandosi ad uno specifico recettore. Tuttavia, lo spettro d'azione dell'Epo non si limita solo all'eritropoiesi: il coinvolgimento dell'Epo è stato rilevato in svariate condizioni, sia fisiologiche che patologiche, estranee all'attività eritrogenica. Tali condizioni includono anche alcune patologie dell'apparato genitale femminile, come l'endometriosi [10] ed alcune neoplasie maligne [11,12].

Inoltre, molti studi dimostrano un'attività autocrina e paracrina dell'Epo nel determinare effetti angiogenetici, mitogenici, chemiotattici. Tali attività sono state confermate a livello dell'utero [5,6], dove è provata l'esistenza dell'eritropoietina e del suo recettore (Epo/Epo-R). L'espressione dell'Epo nell'utero è regolata dagli estrogeni. Inoltre l'Epo è prodotta dai miomi giganti nella sindrome eritrocitoso-fibromatosa. Queste osservazioni portano ad ipotizzare che il sistema Epo/Epo-R svolga un'azione cruciale nei miomi giganti associati ad eritrocitosi (da cui il nome di sindrome eritrocitoso-fibromatosa).

Obiettivo di questo studio è valutare l'espressione di Epo e del suo recettore (Epo-R) in un mioma gigante ottenuto da una paziente gravida con sindrome eritrocitoso-fibromatosa.

### Materiali e metodi

Il mioma oggetto di studio apparteneva ad una paziente giunta alla 38<sup>a</sup> settimana di gestazione. Questo caso è stato confrontato con miomi ottenuti da 16 donne (controlli), 8 gravide a termine e 8 non gravide.

La paziente con sindrome eritrocitoso-fibromatosa (età: 34 anni; un taglio cesareo pregresso) presentava una gravidanza in regolare evoluzione, con evidenza ecografia di una massa parauterina solida, con ecostruttura riconducibile a quella di un mioma, delle dimensioni di 29x20x11 cm. I parametri ematochimici erano normali, ad eccezione dell'emocromo. Infatti l'emoglobinemia era 15 g/dl (v.n. 11,6-14,9), l'ematocrito 48,3% (v.n. 35,0-44,5%), e la conta dei globuli rossi 5,75 milioni/ $\mu$ l (v.n. 3,89-5,2). Il tasso ematico di Epo era 17 mU/ml (valore normale <20). Tali valori sono compatibili con una diagnosi di eritrocitosi.

L'attenta valutazione ostetrica del caso poneva l'indicazione per un parto operativo. Nel corso del taglio cesareo, dopo l'estrazione di un feto vivo e l'isterorrafia, fu osservato che il mioma gigante la grande massa era inserito sulla parete posteriore della regione uterina

istmocervicale. Data l'incapacità dell'utero di contrarsi adeguatamente, la grandezza del mioma e le sue localizzazioni, e considerata l'impossibilità di ottenere l'emostasi, fu deciso per un'isterectomia totale.

Due giorni dopo l'intervento, l'emocromo della paziente presentava i seguenti valori: emoglobina 10,7 g/dl, ematocrito 32,2 % e conta eritrocitaria 4,6 milioni/ $\mu$ l.

Il decorso postoperatorio fu fisiologico e la paziente fu dimessa in settimana giornata. Due mesi dopo l'intervento, il livello di emoglobina era 13,4g/dl, l'ematocrito 41%, i globuli rossi 4,63 milioni/ $\mu$ l; l'Epo era inferiore a 5 mU/ml. Il ritorno a parametri ematologici fisiologici dopo l'intervento conferma la diagnosi di sindrome eritrocitoso-fibromatosa.

L'esame anatomico-patologico ha confermato la natura miomatosa della massa asportata. Su campioni di miomi adeguatamente processati per la metodica immunocitochimica è stata valutata l'espressione di Epo e di Epo-R. La stessa procedura è stata eseguita per i miomi del gruppo di controllo.

Per indicare la positività per Epo, Epo-R e CD34 è stato utilizzato il seguente score semiquantitativo: +++ (intensa positività), ++ (moderata), + (debole).

#### Risultati

Nel mioma gigante, Epo ed Epo-R hanno mostrato una forte immunoespressione (+++). In particolare, l'espressione di Epo era più marcata nelle aree normo/ipercellulari circostanti le zone di degenerazione ialina e l'espressione di Epo-R era maggiore nell'endotelio vascolare ed alla periferia del mioma. Tutti i miomi ottenuti dalle donne gravide del gruppo di controllo hanno mostrato una positività per l'Epo, debole in 4 casi (50%), moderata nei rimanenti 4. L'espressione di Epo-R era assente in due casi (25%), debole in 5 (62,5%) e moderata in un caso (12,5%). Nessun caso ha esibito una forte immunoreattività per Epo o Epo-R.

Nei miomi ottenuti dalle donne non gravide del gruppo di controllo, l'espressione di Epo è risultata assente in 3 casi (37,5%), debole in 4 casi (50%) debole, moderata in un caso (12,5%) moderata. L'immunoespressione di Epo-R è risultata debole in 4 casi (50%) ed assente nei restanti 4 (50%).

La vascolarizzazione del mioma gigante è risultata significativamente più intensa rispetto ai miomi del gruppo di controllo.

#### Discussione

L'Epo è il fattore principale coinvolto nell'eritropoiesi ed è a sua volta regolato dalla concentrazione di ossigeno [13]. Inoltre, è stata verificata l'esistenza del sistema Epo/Epo-R in numerosi tessuti sia a sviluppo normale che neoplastico, rilevando proprietà angiogenetiche e mitogeniche dell'Epo. Nei tumori solidi, i livelli di Epo ed Epo-R sono incrementati dall'ipossia, che rappresenta un meccanismo biologico atto a stimolare la progressione tumorale; pertanto, il promuovere la crescita e la vitalità dei tumori maligni può essere considerata tra le proprietà del sistema Epo/Epo-R [12].

Nell'utero l'Epo prende parte ai processi angiogenetici coinvolti nel rimodellamento ciclico del miometrio funzionale. In particolare, l'espressione di Epo ed Epo-R cambia completamente nel corso il ciclo mestruale [14] e sembra essere estrogeno-dipendente [15].

Numerose teorie sono state proposte per spiegare la patogenesi della sindrome eritrocitoso-fibromatosa [1]: shunt arterovenosi, sostanziale grandezza del mioma, compromissione della funzione polmonare, ipossia locale, alterazione della vita media eritrocitaria, alterata sintesi renale di Epo, diretta produzione di Epo da parte del mioma. In particolare, la produzione di Epo dal tessuto miomatoso è stata variamente confermata da indagini immunocitochimiche [6].

Abbiamo osservato una forte espressione di Epo (significativamente più elevata rispetto ai controlli) nelle cellule muscolari lisce del mioma gigante oggetto dello studio, accanto ad una

forte espressione di Epo-R. Nel caso in esame, rispetto ai controlli, l'espressione di Epo-R non solo è risultata maggiore, ma anche con una localizzazione diversa, limitata quasi esclusivamente alle cellule dell'endotelio vascolare, posto nella periferia della lesione.

Un incostante e debole segnale di Epo-R si è anche ritrovato nelle cellule muscolari lisce dell'utero.

#### Conclusioni

I nostri risultati mostrano che la forte espressione di Epo ed Epo-R nel mioma gigante della paziente oggetto di studio è differente dai miomi del gruppo di controllo. Considerando le proprietà mitogeniche ed angiogeniche dell'Epo, abbiamo ipotizzato che essa, oltre a stimolare l'emopoiesi tramite un'attività sistemica, abbia uno specifico ruolo nell'accrescimento atipico del mioma gigante, osservato nella nostra paziente, come pure quasi sempre nella sindrome eritrocitoso-fibromatosica.

La forte espressione di Epo-R nelle cellule endoteliali del mioma gigante ci permette di ipotizzare che l'Epo abbia contribuito a determinarne la notevole dimensione, stimolando attivamente l'angiogenesi. Infatti, nel mioma gigante è stata dimostrata una vascolarizzazione più intensa rispetto ai miomi di controllo. La forte espressione di Epo ed Epo-R nel mioma gigante potrebbe rappresentare un importante sistema biologico promuovente la crescita tumorale. L'Epo prodotta nelle cellule muscolari del mioma agisce localmente sulle cellule endoteliali, aumentando la vascolarizzazione e dunque l'apporto di ossigeno alla lesione. In più, ricordando la produzione estrogeno-dipendente dell'Epo nell'utero, è verosimile che gli estrogeni determinino anche una up-regulation del sistema Epo/Epo-R nei miomi uterini, che sono particolarmente dipendenti dagli steroidi ovarici.

Alla luce dei nostri risultati, ipotizziamo che l'Epo abbia effetti mitogenici sulle cellule muscolari lisce miometriali, contribuendo anche tramite meccanismi autocrini all'abnorme crescita del mioma. Tutte queste ipotesi sono coerenti con la teoria di una deregolazione locale di fattori di crescita vasoattivi o dei loro recettori nella patogenesi della fibromiomas uterina. Inoltre abbiamo confermato una bassa, ma specifica espressione di Epo nei miomi uterini nelle pazienti senza eritrocitosi e abbiamo provato una modica espressione di Epo-R in queste lesioni [6].

E' emersa poi, una differenza significativa nell'espressione del sistema Epo/Epo-R tra i miomi delle donne gravide e di quelle non gravide, per cui è possibile ipotizzare un ruolo della gravidanza nella regolazione del sistema.

I nostri risultati, sebbene interessanti, sono limitati all'osservazione di una sola paziente con la rara sindrome eritrocitoso-fibromatosica. Sono pertanto necessari ulteriori studi di conferma, allo scopo di valutare eventuali possibili implicazioni cliniche e terapeutiche.

#### Bibliografia

1. LevGur M, Levie MD. The myomatous erythrocytosis syndrome: a review. *Obstet Gynecol*, 86: 1026-30,1995
2. Babuna C, Gardner GH, Greene RR. Erythrocytosis associated with a myomatous uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 77: 424-9,1959
3. Fleming AR, Markley JC. Polycythemia associated with uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol*, 74: 677-9,1957
4. Thomson AP, Marson FGW. Polycythemia with fibroids. *Lancet*, 2:759-60,1953
5. Suzuki M, Takamizawa S, Nomaguchi K. Erythropoietin synthesis by tumour tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. *Br J Haematol*, 113: 49-51,2001.
6. Yokoyama Y, Shinohara A, Hirokawa M. Erythrocytosis due to an erythropoietin-producing large uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest*, 56: 179-83,2003

7. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med*, 228: 1-14,2003
8. Silva M, Grillot D, Benito A. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*,88: 1576-82,1996.
9. Tilbrook PA, Klinken SP. Erythropoietin and erythropoietin receptor. *Growth Factors*, 17: 25-35,1997
10. Matsuzaki S, Canis M, Yokomizo R. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*, 18: 152-6,2003
11. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis*, 23: 1797-805,2002
12. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM. Hypoxia-inducible erythropoietin signalling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol*, 162:1789-806,2003
13. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M et al Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem*, 273: 25381-7,1998
14. Yokomizo R, Matsuzaki S, Shigeki U et al Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, 8: 441-6,2002
15. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 275: 39754-61,2000

**TUMORE ADENOMATOIDE DELL'UTERO TRATTATO CON GnRH-a:  
CONSIDERAZIONI CLINICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE**

*Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Stefania Staibano<sup>2</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Fabrizio Pollio<sup>1</sup>, Massimo Mascolo<sup>2</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Filippo Castaldo<sup>1</sup>, Massimo Pontillo<sup>1</sup>, Gennaro Ilardi<sup>2</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche Urologiche e Medicina della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

**Introduzione:** I tumori adenomatoidi dell'utero sono rare neoplasie benigne di origine mesoteliale, non ormono-dipendenti (1). Nel 60% dei casi essi coesistono con i leiomiomi, da cui sono ecograficamente indistinguibili (2). Oggetto di questo studio è un caso di tumore adenomatoide, definito ecograficamente come leiomioma e, pertanto, trattato preoperatoriamente con GnRH-a.

**Materiali e metodi:** Lo studio è stato eseguito su una paziente di 27 anni, candidata ad intervento chirurgico per la presenza di 3 miomi intramurali del diametro medio di 4 cm, diagnosticati ecograficamente. La paziente è stata trattata con leuprorelina acetato depot 3.75 mg al mese per tre mesi ed è stata successivamente sottoposta a miomectomia multipla. La diagnosi istologica effettuata sui noduli asportati ha concluso per tumori adenomatoidi, sui quali è stata valutata l'espressione immunoistochimica del recettore alfa per gli estrogeni, del recettore per il progesterone e dei fattori di crescita peptidici EGF-R, b-FGF, VEGF, PLGF, CTGF, TGF-beta (1 e 3) e PDGF.

**Risultati:** Al termine della terapia, è stata osservata una riduzione volumetrica dei 3 noduli di circa il 20%. L'esame istologico, in accordo con quanto descritto in letteratura, ha evidenziato la presenza di raggruppamenti di fibrocellule muscolari lisce miometriali nel contesto dei tumori adenomatoidi studiati. L'espressione immunoistochimica dei recettori e dei fattori di crescita analizzati è risultata negativa, ad eccezione di una debole positività, non significativa, per il b-FGF.

**Conclusioni:** Il tumore adenomatoide è ecograficamente indistinguibile dai miomi uterini e, nonostante l'assenza di recettori per estrogeni e progesterone e la negatività per i principali fattori di crescita peptidici, può mostrare una riduzione di volume in seguito a terapia farmacologica con GnRH-a. Alla luce di quanto riportato, questo effetto potrebbe dipendere da un'azione dei GnRH-a non sulle cellule del tumore adenomatoide, ma sulle fibrocellule miometriali in esso incluse. Tale imprevista efficacia della terapia con GnRH-a potrebbe avvalorare una errata diagnosi clinica di fibromatosi uterina.

**Bibliografia**

- 1) Seiji Hanada, Yutaka Okumura and Kiyotaka Kaida. Multicentric adenomatoid tumors involving uterus, ovary, and appendix. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2003; 29:234-8.
- 2) K. Sieunarine, A.S. Cowie, J.D. Bartlett, I. Lindsay and J.R. Smith. A novel approach in the management of a recurrent adenomatoid tumor of the uterus utilizing a Strassman technique. Int. J. Gynecol Cancer 2005; 15:671-5.

ge in a single familial mental retardation (FMR)-1 gene, which is found at Xq 27.3. Fragile X permutation (FRAXA) may occur sporadically. Approximately 10-20% of those women that carry the permutation gene experience premature ovarian failure (POF) with poor response to assisted reproductive treatments.

**Case report:** The authors describe the case of a 29 years old woman with hypergonadotropic amenorrhea, who desired to get pregnant. Screening for FRAXA permutations was performed and the patient started assisted reproductive treatment.

**Conclusions:** The mechanism of the association between FRAXA permutation and POF remains unknown. The authors emphasize the importance of the recognition of the association between POF and the risk of transmitting fragile X syndrome because this may be the only way of preventing this form of inherited male mental retardation.

464

#### Volume measurements of the gestational sac in the first trimester: how to assess the prognosis of the pregnancy in the early gestational age

Katerina Koterova<sup>1</sup>, Ladislav Krofta<sup>1</sup>, Ivana Kucerova<sup>1</sup>, Hana Stefanovicova<sup>1</sup>, Lucia Haakova<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute for the Care of the Mother and Child, Czech Republic

**Introduction:** The aim of the study was to measure the volume of the gestational sac during the first trimester of pregnancy and find any relation between growth abnormalities of the gestational sac and severe complications of pregnancy in the sense of loss of pregnancy or preterm delivery.

**Methods:** The volume was measured using 3D ultrasound and VOCAL Technique. We measured 335 chorionic cavities and 224 amniotic cavities in 335 singleton pregnancies between the 5th and 14th week of gestation. Adverse pregnancy outcome occurred in 34 cases. All measurements were done by two independent investigators. Wisser dating was used.

**Results:** We found a relation between gestational age and gestational sac volume:  $\ln(V_{CD}) = 24,443 + 6,5571 * \lg(t)$  in pregnancies with normal outcome,  $\ln(V_{CD}) = -1,262 + 1,4082 * \ln(t)$  in the cases of pregnancy loss. The regression analysis difference is statistically significant (F-test,  $P < 0,00001$ ). The measurements of two independent investigators were in strong correlation (0,97), there was an acceptable inter-observer variability. Simultaneously there was found a relation between gestational age and shape of the chorionic cavity. There is strong concordance in dating of gestation using Wisser and Hadlock until the 90th day of gestation; both manners of dating become divergent after 90th day of gestation.

**Discussion:** Volume measurements of the gestational sac, especially of the chorionic cavity in the first trimester could

be one of the first methods that could assess the development and prognosis of pregnancy. There is a difference in growth of the chorionic cavity in normal and abnormal ending pregnancies, but that difference was not found in the case of amniotic cavity. In the previous part of this study we found a strong positive linear correlation between CRL and gestational sac volume in normal singleton pregnancies. There were suggested in previous studies that the growth of the gestational sac is abnormal in cases of miscarriage.

**Acknowledgement:** This work is supported by grant project IGA NR8350.

466

#### Klippel-Tranaunay-Weber Syndrome (KTWS) and pregnancy: successful obstetrical management

Ilma Floriana Carbone<sup>1</sup>, Maria Antonietta Di Nardo<sup>1</sup>, Francesca Ciociola<sup>1</sup>, Anna Busiello<sup>1</sup>, Marianna De Falco<sup>1</sup>, Luigi Improda<sup>1</sup>, Andrea Di Lieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrical-Gynecologic and Urological Science and Reproductive Medicine, University Federico II of Naples, Italy

**Introduction:** KTWS is a rare congenital disease with variable expression, characterized by extreme varicose veins, bone and soft tissue hypertrophy and pigmentary skin changes in the affected limbs. Pregnancy in patients with KTWS is reported only in few cases. This syndrome is known to be associated with increased maternal and fetal morbidity: adverse pregnancy outcomes may include haemorrhage, deep or superficial thrombosis, pain in the affected limb, disseminated intravascular coagulation, Kasabach-Merrill syndrome and placental abnormalities. Intrauterine growth restriction and preterm birth may occur. The mode of delivery should be considered carefully in an attempt to minimize the risk of possible haemorrhage for vascular changes in the cervix and lower uterine segment.

**Methods:** A primigravida with the Klippel-Tranaunay syndrome was referred to our unit at 14 weeks' gestation. Careful physical examination, including colposcopic study, serial coagulation evaluations, consulting with hematologists, radiologists, vascular surgeons and anesthesiologists were made.

**Results:** Successful delivery of a healthy infant was achieved. No complications occurred.

**Conclusions:** The maternal and fetal morbidity during pregnancy in women with KTWS is proportional to the severity of disease, which can be exacerbated by pregnancy. Multidisciplinary management is required for the successful of pregnancy. A systematic antepartum care, a careful choice of delivery plan and flexibility are keys for successful maternal and fetal outcomes.