

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche Generali e dei Servizi**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/H1

Settore Scientifico disciplinare: MED/40

**Basi molecolari per uno screening non invasivo delle malformazioni cardiache
congenite al secondo trimestre di gravidanza**

Presentata da: Alessandra Curti

Coordinatore Dottorato

Prof. Luigi Bolondi

Relatore

Prof. Antonio Farina

Esame finale anno 2017

INDICE

1 Introduzione	3
1.1 Epidemiologia dei difetti cardiaci congeniti	3
1.2 Meccanismi genetici implicati nei difetti della cardiogenesi	5
1.3 Screening delle malformazioni cardiache fetali	6
1.3.1 Accuratezza della diagnosi ecografica in utero	7
1.3.2 Basi per uno screening molecolare non invasivo	12
2 Obiettivi dello studio	15
3 Materiali e metodi	16
3.1 Modalità di prelievo del tessuto umano	16
3.2 Procedure di laboratorio	16
3.3 Analisi dei risultati di laboratorio	23
4 Risultati	24
5 Discussione	31
6 Conclusioni	34
7 Bibliografia	35

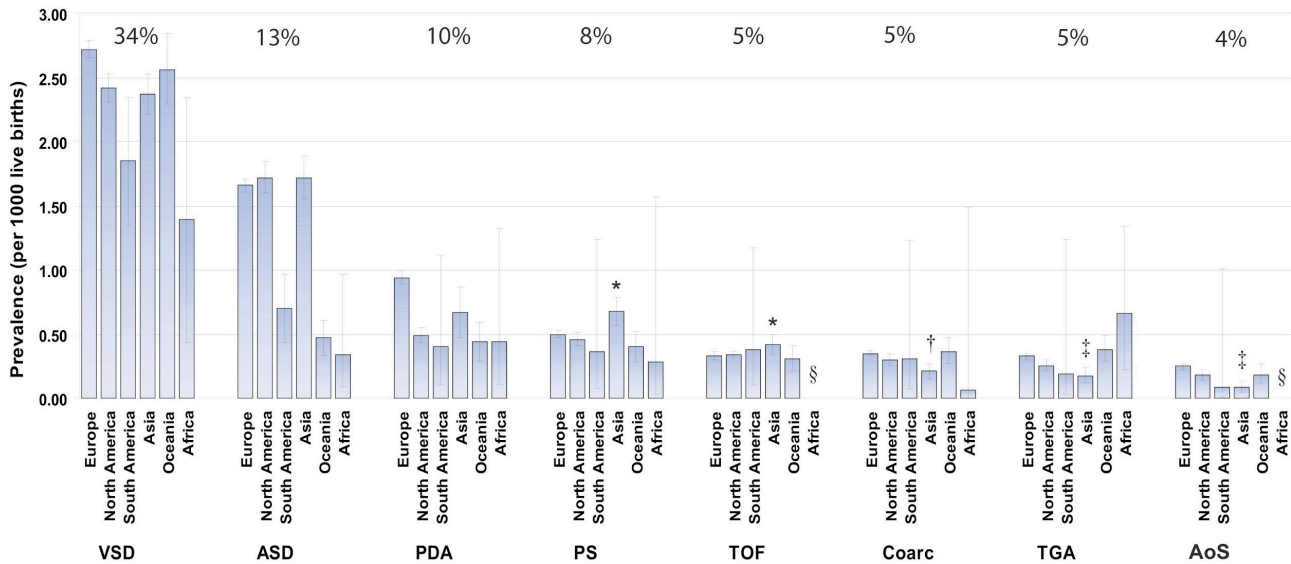
INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia dei difetti cardiaci congeniti

Entro la definizione di congenital heart disease (CHD) si fa attualmente rientrare, come suggerito da Mitchell et al. (1), qualsiasi “evidente anomalia strutturale del cuore o dei grandi vasi intratoracici che abbia, anche potenzialmente, significato funzionale”. Dalla categoria così individuata risultano a priori escluse condizioni minori quali la persistenza del dotto arterioso nei nati prematuri, la valvola aortica bicuspidale e il prolasso della valvola mitrale, oltre a varie cardiomiopatie e aritmie congenite. La reale incidenza dei difetti cardiaci congeniti non è quindi semplice da determinare anche a causa di una certa ambiguità che persiste nel raggiungere una definizione univoca. Certo è che una CHD è, benché spesso diagnosticata più tardi, presente sin dalla nascita. La stima di 8 su 1000 nati vivi, comunemente accettata in letteratura come l'approssimazione migliore (2), non tiene in effetti conto delle due anomalie forse più comuni: la valvola aortica bicuspidale (BAV) e il prolasso della mitrale (MVP). Se si considera poi la sostanziale disomogeneità geografica e una distribuzione temporale che dagli anni 1930 a oggi è decisamente in crescita, sembra opportuno estendere il range stimando un'incidenza reale compresa tra 6.9 e 9.3 per mille nati vivi per le sole CHD isolate. La stessa aumenta al 3-4% nei nati morti e al 10-25% negli aborti spontanei. (3) Nel complesso, pertanto, le CHD rappresentano le malformazioni fetali e neonatali in assoluto più frequenti. Nel più ampio contesto delle lesioni cardiache congenite, a un 70-80% di malformazioni isolate fa da controparte un 20-30% di casi in cui esse si inseriscono entro un quadro sindromico comprendente contestuali anomalie extra-cardiache. (4)

Per la distribuzione relativa si rimanda al grafico di seguito (Figura 1).

Figura 1. Prevalenza alla nascita delle principali CHD



Più spesso, si tratta di condizioni a eredità multifattoriale, in cui l'espressione fenotipica di una predisposizione geneticamente determinata è favorita da fattori ambientali: in questi casi la trasmissione sfugge alle leggi mendeliane, e il rischio di occorrenza è piuttosto proporzionale al numero dei consanguinei affetti. Solo nel 5% dei casi, la cardiopatia si riscontra in sindromi cromosomiche numeriche e strutturali (trisomie 21-18-13; monosomia X; delezioni 8p-5p-4p; microdelezioni 22q11: DiGeorge e 7q11.23: Williams) e solo nel 3% si trasmette come un carattere autosomico mendeliano in forma di sindrome (Noonan, Marfan, Holt-Oram, Ellis-van Creveld) o di difetto isolato.

I meccanismi patogenetici alla base delle CHD sono molteplici e, poiché dominati dalla complessità, non ancora pienamente compresi. Di fatto, l'alterazione genetica di base interviene su una serie di processi che concorrono all'organogenesi cardiovascolare, agendo tra l'altro su fenomeni di migrazione cellulare ecto-mesenchimale, emodinamica intracardiaca, apoptosi, struttura della matrice extracellulare, crescita direzionata di strutture in formazione, looping del tubo cardiaco primitivo e determinazione del situs. Lo studio e l'identificazione dei geni-malattia sono resi complessi dalla fondamentale eterogeneità di locus e dall'espressività variabile delle singole modificazioni genetiche.

Non va poi sottovalutata l'evidenza che alterazioni del flusso ematico determinate dal difetto anatomico primario sono verosimilmente in grado di influenzare a loro volta - e in maniera anche significativa - lo sviluppo morfo-funzionale del resto della circolazione. Per citare un esempio, con

riferimento alle lesioni ostruttive dell'efflusso sinistro, è dato ormai accertato (5) che la presenza di un'atresia della valvola mitrale in utero può impedire la normale morfogenesi del ventricolo sinistro, e della valvola aortica e del segmento prossimale dell'aorta. Eventi postnatali sono parimenti in grado di intervenire significativamente sul quadro clinico di una specifica malformazione isolata: l'obliterazione programmata del dotto arterioso rappresenta, ad esempio, un evento determinante nello sviluppo di una coartazione aortica.

1.2 Meccanismi genetici implicati nei difetti della cardiogenesi

Quelli che fino a non molto tempo fa erano i soli dati consolidati circa la morfogenesi del cuore e dei grandi vasi erano essenzialmente derivati dallo studio di sezioni embriologiche in serie, successivamente ricostruite in modelli tridimensionali di più facile comprensione. Prima dell'introduzione di tecniche molecolari si era ben lungi dalla possibilità di seguire il destino programmato di gruppi specifici di elementi cellulari nell'embrione, o di risalire in maniera puntuale alle tappe di sviluppo di precise strutture cardiache - pur derivanti verosimilmente dallo stesso progenitore comune.

L'introduzione di tecniche molecolari ha completamente rivoluzionato l'approccio: l'analisi clonale retrospettiva dei precursori cardiaci in modelli animali ha permesso di determinare il destino dei singoli precursori durante il processo della cardiogenesi. A corollario, la nozione prima fondamentale di un tubo cardiaco primitivo suddiviso in segmenti ognuno dei quali deputato a una precisa funzione è stata superata. Si è invece dimostrato che le diverse parti di un cuore in fase di formazione si aggiungono via via al tubo cardiaco primitivo in corso di allungamento, e che quest'ultimo fornisce in ultima istanza il contingente cellulare per il solo ventricolo sinistro. Il tubo cardiaco quindi, connesso all'embrione tramite il mesoderma dorsale, possiede una struttura simmetrica il cui sviluppo avviene per giustapposizione progressiva di elementi alle estremità caudali (polo venoso) e craniale (polo arterioso e tratto di efflusso).

Il lavoro di Nora (6), che ha per primo introdotto - nell'anno 1968 - l'ipotesi di un'eredità multifattoriale alla base delle lesioni cardiache congenite, ha trovato le necessarie premesse nell'osservazione che la stessa CHD ricorre nella stessa famiglia manifestandosi con fenotipi anatomici a loro volta ricorrenti, ma non perfettamente sovrapponibili. La ricerca su modelli animali ha appurato che, contrariamente a quanto s'ipotizzava in precedenza, l'alterazione di un singolo meccanismo embriologico durante lo sviluppo organogenetico è in grado di determinare fenotipi cardiaci differenti in termini anatomici e quindi fisiopatologici, a cui concorre però un unico substrato embriologico. L'esempio dello spettro di malformazioni tipicamente repertate nel contesto della sindrome di DiGeorge conferma il concetto applicandolo alle cellule umane: i nati

con questa anomalia citogenetica (Del 22q11.2) presentano infatti un coinvolgimento variabile del tratto di efflusso ventricolare o degli archi aortici. In definitiva, Nora ha consolidato il concetto che un'anomalia molecolare definita, agendo tramite disregolazione del relativo meccanismo embriogenetico, possa essere alla base di un gruppo di CHD con espressione fenotipica eterogenea, ma derivazione embriologica comune.

Inoltre, come già si è accennato in precedenza, è ormai concetto corrente che lo sviluppo delle camere cardiache e dei relativi vasi sia legato qualitativamente e quantitativamente anche alle variabili emodinamiche che si istituiscono in utero. Una riduzione del flusso ematico a livello delle sezioni sinistre, per fare un esempio coerente, concorre a determinare coartazione dell'aorta da un lato, e ipoplasia del ventricolo sinistro dall'altro. L'idea che tali due cardiopatie riconducibili alla categoria delle LVOT appartengano fondamentalmente alla medesima classe embriologica è stata ampiamente dimostrata da diverse evidenze sperimentali (la ricorrenza di cardiopatie simili con diversi gradi di severità all'interno della stessa famiglia; la progressione prenatale osservata nelle LVOT; l'individuazione della stessa mutazione a carico di NOTCH1 in pazienti appartenenti alla stessa famiglia e portatori di fenotipo cardiaco patologico diverso).

L'ampia eterogeneità genica che si osserva all'interno di ogni gruppo di CHD rende il quesito diagnostico particolarmente complesso, permettendo però anche una analisi della relazione genotipo-fenotipo per le rispettive cardiopatie. In effetti nella trasposizione dei grandi vasi, in genere riferita al gruppo dei difetti cono-truncali, si sono individuate ad esempio specifiche mutazioni relative ai geni della lateralità; ciò giustificherebbe tra l'altro la mancanza di associazione tra trasposizione dei grandi vasi e delezione 22q11, che è invece un tratto comune alle CNTRA. E' lecito, in conclusione, ipotizzare che determinate cardiopatie riferibili alla medesima categoria possano manifestarsi come risultato finale di meccanismi embriologici distinti, sulla base di distinte alterazioni a livello molecolare.

1.3 Screening delle malformazioni cardiache fetali

Sui complessi processi di morfogenesi cardiaca — che portano alla formazione delle connessioni venose, delle camere atriali e dei ventricoli, delle radici arteriose e dei tronchi intrapericardiaci — non ci si soffermerà ulteriormente in questa sede. Il dato che ci interessa è che nel loro complesso essi si completano molto precocemente: entro la fine dell'8va settimana di gestazione la cardiogenesi può definirsi completa. Tuttavia, per poter osservare una versione in miniatura di quello che sarà effettivamente il cuore adulto nella posizione definitiva, e per ottenere una visualizzazione soddisfacente delle valvole atrioventricolari e delle connessioni ventricolo-arteriose, bisogna aspettare la 12esima settimana. Se si considera che all'inizio del secondo

trimestre la lunghezza totale dell'asse cardiaco non eccede una media di 8 mm, bisogna ammettere che differenziare le diverse strutture cardiache a tale epoca gestazionale rimane una sfida indipendente dall'esperienza dell'ecografista. La finestra di rapido accrescimento fetale che occorre tra la 12esima e la 17esima settimana vede anche il volume cardiaco raddoppiare. Ogni settimana ulteriore aumenta esponenzialmente la possibilità di una visualizzazione accurata delle strutture in crescita.

1.3.1 Accuratezza della diagnosi ecografica in utero

In generale, se si pensa all'individuazione precoce di una lunga serie di patologie malformative nel feto, l'ecografia ostetrica rappresenta attualmente la procedura diagnostica di più largo impiego alla luce dei suoi vantaggi primari che sono da individuare sicuramente nelle caratteristiche di non invasività e basso costo. La presenza di una finestra acustica pressoché ottimale data dal liquido amniotico, insieme all'esigenza di evitare l'esposizione fetale a radiazioni ionizzanti, hanno reso sempre più esclusivo l'uso dell'ecografia nel controllo per immagini della gravidanza. La sorveglianza fetale si applica correntemente in Italia (7) a tutte le gravide mediante l'esecuzione di tre ecografie al primo (11-14 settimane), secondo (20-22 settimane) e terzo (28-32 settimane) trimestre.

Sottolineando ancora una volta che la cardiogenesi si completa entro l'8va settimana di gestazione, è evidente che la tecnica ultrasonografica va considerata lo standard assistenziale anche per l'individuazione precoce di sue eventuali deviazioni patologiche. Già a 16 settimane di gestazione è possibile studiare le strutture cardiache fetali per via transaddominale, ottenendo informazioni sulla fisiologia cardiaca e placentare mediante il ricorso a tecniche Doppler. L'approccio transvaginale, di più recente introduzione, permette l'acquisizione di clichés utili a fini diagnostici già a 13-14 settimane. (8)

La prima rilevazione dell'attività cardiaca fetale risale agli inizi degli anni 1970 (9), quando l'introduzione nella pratica ecografica della tecnologia M-mode ha permesso di rilevare i movimenti delle pareti miocardiche e di documentare le fasi del ciclo cardiaco. Nel decennio successivo, Lindsey D. Allan (10) ha per primo definito le correlazioni tra anatomia del cuore fetale e immagini ecografiche rilevate in real time, ponendo le basi per l'individuazione prenatale ultrasonografica di eventuali difetti di sviluppo delle stesse strutture.

Da area specialistica, l'ecocardiografia fetale si è progressivamente trasformata in settore di cura a più ampio spettro. Se inizialmente le figure professionali coinvolte si riducevano essenzialmente ai cardiologi pediatri, e la popolazione di studio coincideva con gruppi di gravidanze considerate ad alto rischio, si è presto notato che lo screening così impostato selezionava

solo il 10% (11) dei feti effettivamente malati, riguardando la maggior parte delle CHD gravidanze senza alcun fattore di rischio anamnestico.

Tabella 1. Fattori di rischio riconosciuti per difetti cardiaci congeniti

<i>Fattori di rischio fetali</i>	<i>Fattori di rischio materni</i>	<i>Fattori di rischio familiari</i>
Anomalie cromosomiche	Malattie materne:	Positività anamnestica per CHD
Anomalie extracardiache	- cardiopatie congenite	Positività anamnestica per
Onfalocele	- diabete	quadri sindromici associati a
Atresia esofago-duodenale	- collagenopatie vascolari	CHD
Ernia diaframmatica	- positività anticorpale anti-RA/ Lo	
Aumento della traslucenza nucale	- fenilchetonuria	
Ispessimento della plica nucale	Esposizione esogena:	
Idrope non immune	- alcol	
Poli- o oligoidramnios	- anticonvulsivanti	
Aritmia cardiaca fetale	- litio	
	- acido retinoico	
	- virus rubeolico, Coxsackie, CMV e Parvovirus B19	

Verso la metà degli anni Ottanta un gruppo francese ha quindi proposto l'inclusione della valutazione ecografica del cuore fetale in tutte le gravidanze sottoposte routinariamente a esame ultrasonografico nel secondo trimestre allo scopo di escludere malformazioni maggiori. I primi programmi di screening per le CHD su popolazioni a basso rischio anamnestico prevedevano la semplice visualizzazione delle quattro camere, che pure permette di valutare molte caratteristiche del cuore fetale.

Contrariamente alle aspettative, i primi risultati in termini di sensibilità dello screening furono deludenti. Bull et al. (12) hanno in particolare studiato, nel periodo compreso tra 1993 e 1995 nel Regno Unito, l'efficacia della valutazione ecografica mediante scansione quattro-camere nell'identificazione di cardiopatie congenite in feti a basso rischio, calcolando una sensibilità complessiva del 25% e sottolineando significative variazioni (0-70%) geografiche, molto intuitivamente legate alla presenza sul territorio di iniziative di training degli operatori.

L'evidenza che l'esperienza dell'ecografista è in ultima istanza la variabile più significativa è stata confermata da numerosi studi simili, e in primis dal registro EUROCAT (13): la capacità di identificare cardiopatie congenite in epoca prenatale si è dimostrata significativamente diversa nei vari paesi europei, risultando direttamente proporzionale alla presenza di protocolli standardizzati per la valutazione dell'anatomia fetale nel secondo trimestre di gravidanza.

Non va sottovalutato, come fattore in grado di giustificare la scarsa sensibilità dell'ecografia del secondo trimestre nell'individuazione delle CHD, che più del 40% dei difetti del cuore fetale non sono visualizzabili nella scansione quattro camere. (14) Per questa ragione è fondamentale includere nelle sezioni ecografiche standard la scansione dei due tratti di efflusso. La visualizzazione dell'efflusso dal ventricolo sinistro (LVOT) e destro (RVOT) è oggi considerata dalle linee guida internazionali (15) parte integrante dello screening cardiaco fetale: bisogna in particolare verificare che i grossi vasi siano approssimativamente di simili dimensioni e che s'incrocino ad angolo retto all'origine, in uscita dai rispettivi ventricoli (cross over). Scansioni assiali aggiuntive consentono di visualizzare ulteriori dettagli dei grossi vasi e delle strutture circostanti, attraverso uno sweep in continuo che parte dal RVOT e, passando per la scansione "tre-vasi" (3V), arriva a quella "tre-vasi e trachea" (3VT). Questi piani di scansione sono finalizzati alla visualizzazione delle strutture vascolari che decorrono nella parte alta del mediastino e consentono la valutazione del loro numero (in situazione di normalità, si riconosceranno: arteria polmonare, aorta e vena cava superiore), delle dimensioni relative, dei rapporti reciproci e della relazione spaziale con le vie aeree (trachea).

L'utilizzo del Color-Doppler fornisce informazioni aggiuntive sull'emodinamica fetale, permettendo inoltre l'identificazione prenatale di difetti minori non evidenti sulla base del dato morfologico.

Attualmente, lo screening per le CHD viene quindi eseguito routinariamente, previa anamnesi tesa a rilevare eventuali fattori di rischio, mediante visualizzazione delle quattro camere cardiache e dei tratti di efflusso durante l'ecografia morfologica del secondo trimestre. Uno studio di Allan e Bromley (11) ha riportato una sensibilità globale del 63% per la sola scansione quattrocamere, che sale all'83% se si aggiunge lo studio degli efflussi.

Le gravidanze giudicate - sulla base del dato morfologico o dell'anamnesi - a rischio sono quindi indirizzate all'indagine di terzo livello per definire anatomia e prognosi dell'eventuale cardiopatia. L'ecocardiografia fetale di terzo livello, che implica la stretta collaborazione di specialisti ostetrici e cardiologi pediatri, definisce l'anatomia cardiaca mediante un approccio sistematico-segmentario, definendo situs viscerico-atriale, ritorni venosi sistemici e polmonari, connessione atrio-ventricolare, loop ventricolare, connessione ventricolo-arteriosa, grandi arterie e arco aortico. Il ricorso a tecniche M-mode e Color-Doppler consente infine un'agevole valutazione rispettivamente della funzionalità ventricolare (mediante misurazione dei diametri delle cavità e degli spessori parietali) e dei flussi intra ed extra-cardiaci.

La visione completa della morfologia, della funzionalità e dell'emodinamica del cuore fetale derivata dall'ecocardiografia di terzo livello permette di identificare la gran parte dello spettro

malformativo cardiaco congenito. Rimane tuttavia ancora discreta la quota di errori diagnostici legati a caratteristiche intrinseche degli ultrasuoni che, sommandosi a fattori multipli certo contribuenti ma non modificabili, ne limitano nella pratica la capacità di individuare nella popolazione generale i soggetti malati:

- i.* caratteristiche del difetto (dimensioni, influenza emodinamica, timing di esordio) in base all'epoca gestazionale;
- ii.* conformazione fisica della gravida e, più in generale, scarsa ecogenicità dei tessuti addominali materni;
- iii.* oligo- o ploidramnios, movimenti fetali, coni d'ombra costo-vertebrali;
- iv.* potere risolutivo delle apparecchiature in dotazione.

Soprattutto nel caso di anomalie con bassa prevalenza, è evidente che il potere predittivo dell'esame risulta globalmente compromesso. Gli studi in merito mettono in evidenza in particolare la non superabile operatore-dipendenza di una metodica che si basa sul dato morfologico: è questa, soprattutto, che rende ragione di tassi di accuratezza molto diversi. Meyer-Wittkopf et al. (16) hanno dimostrato una corrispondenza tra diagnosi prenatale e follow up pediatrico per il 59% delle ecografie eseguite da ostetrici versus il 95% (2% falsi positivi e 5% falsi negativi) laddove ad acquisire ed interpretare le immagini era invece un cardiologo pediatra.

Nel 2016, in conclusione, la maggior parte delle cardiopatie congenite strutturali è potenzialmente caratterizzata con buona accuratezza mediante ecocardiografia fetale. Il riconoscimento dell'anomalia e la formulazione di previsioni condivise circa la prognosi della stessa costituisce la base per il counselling e, al di là di eventuali ricorsi all'interruzione di gravidanza, i dati disponibili in letteratura sono concordi nel suggerire che la diagnosi precoce ha un impatto diretto e significativo sull'outcome finale relativamente a sopravvivenza, morbilità postnatale e costi.

Molto intuitivamente, la diagnosi prenatale rende possibile un'attenta ed adeguata presa in carico del difetto nell'immediato post partum (in tutte le cardiopatie dotto-dipendenti per il circolo sistemico, ad esempio, l'infusione di prostaglandine E1 è una misura standard molto semplice ma in grado, da sola, di prevenire gravi quadri di scompenso cardiaco).

L'introduzione routinaria dell'ecocardiografia fetale ha permesso peraltro di comprendere meglio l'evoluzione potenziale di talune CHD; nonostante il cuore fetale sia completamente formato nel momento di esecuzione dell'esame, le strutture cardiache rimangono in crescita e, per fare un esempio, una cavità cardiaca solo lievemente ipoplasica a 16 settimane può evolvere assumendo a termine caratteri di gravità che richiedono l'impostazione di protocolli assistenziali ad hoc.

Il passo successivo è l'intervento diretto per lesioni cardiache specifiche; il potenziale riguarda attualmente soprattutto le lesioni ostruttive limitate al ventricolo sinistro. Il razionale alla base della correzione è fondato sull'evidenza che la rimozione della lesione ostruttiva del tratto di outflow consente lo sviluppo corretto del ventricolo affetto. La chirurgia in utero rimane un'opzione futura su cui esiste già, tuttavia, un considerevole numero di ricerche circa l'impatto su modelli animali.

Per concludere la sezione, si ricapitolano qui di seguito le ragioni che hanno portato ad includere la visualizzazione del cuore fetale nell'ecografia morfologica di routine del secondo trimestre di gravidanza, attualmente standard assistenziale nella maggior parte delle strutture ostetriche del mondo occidentale.

In primo luogo, le CHD costituiscono anomalie congenite piuttosto frequenti (6 su 1000 nati vivi per le forme da moderate a gravi, fino a 75 su 1000 nati vivi qualora si includano lesioni lievi senza particolare significato emodinamico), con impatto sulla salute globale e adatte all'impostazione di protocolli di screening.

In secondo luogo, considerata la forte associazione con anomalie extracardiache (8-42%) ed alterazioni cromosomiche (5-13% dei nati vivi; 15-50% nelle casistiche prenatali), è evidente che l'individuazione di un difetto cardiaco nel feto rappresenta una indicazione primaria per un approfondimento che coinvolga il genetista, nonché per una valutazione dettagliata delle strutture extracardiache. Un piano di counselling deve in qualsiasi caso essere proposto alla coppia.

In terzo luogo, oltre che a tassi non trascurabili di mortalità, alle CHD si associa significativa morbilità neonatale e pediatrica: con riferimento ai dati globali, circa un quarto di tutti i neonati muore a causa di malformazioni congenite, e un terzo di tali decessi è correlato ad anomalie cardiache (3). Se le CHD costituiscono la principale causa di morte in età neonatale e nella prima infanzia, il dato non è da riferire solo alla complessità e centralità delle malformazioni, ma anche all'elevata incidenza delle stesse. Come già detto sopra, la diagnosi precoce ha conseguenze positive sul management post-natale, inclusa l'eventuale indicazione all'espletamento del parto presso una struttura specialistica dotata di divisioni di Cardiologia e Cardiochirurgia dedicate. Sono ampiamente dimostrati (13) una generale riduzione dei tempi pre-operatori nonché minori permanenza in terapia intensiva ed evoluzione verso quadri di grave compromissione emodinamica.

In quarto luogo, nonostante gli sforzi per migliorare l'individuazione delle anomalie neonatali attraverso l'introduzione di programmi strutturati, i difetti del cuore e dei grandi vasi continuano ad essere sottodiagnosticati, persistendo un'enorme variabilità (19-48%) nelle percentuali di individuazione tra le varie aree geografiche e nei diversi centri. La sensibilità dello

screening è certo migliore in popolazioni selezionate ad alto rischio. Se è vero però che la maggior parte (80%) dei bimbi affetti nasce da genitori senza alcun fattore di rischio identificabile, allora la percentuale di rilevamento delle CHD dipende tuttora, in grande misura, dalla sensibilità dell'esame ecografico di primo livello.

1.3.2 Basi per uno screening molecolare non invasivo

Alla luce dei dati appena discussi (con particolare riferimento, da una parte, alla variabile ma globalmente insoddisfacente accuratezza diagnostica dell'ecografia prenatale; dall'altra, all'annotazione che i difetti cardiaci congeniti costituiscono la malformazione più frequente ritrovandosi l'80% dei casi entro il pool delle gravidanze senza fattori di rischio), appare evidente che l'identificazione di biomarcatori in grado di predire il rischio di un difetto della morfogenesi del cuore e dei grandi vasi comporterebbe un netto miglioramento per quanto concerne l'affidabilità della diagnosi prenatale, con un sicuro impatto anche sugli outcome finali in termini di sopravvivenza e morbilità.

Uno screening delle malformazioni cardiache su base molecolare è tuttavia molto complesso da definirsi in ragione dei numerosissimi geni implicati nel processo morfogenetico. Purtroppo, gli sforzi finora compiuti in tal senso non hanno portato a risultati di rilievo: la misura della traslucenza nucale, il cui aumento è stato a più riprese ipotizzato come fattore di rischio significativo, si è rivelata in ultima istanza un predittore poco potente per quanto riguarda le CHD maggiori in forma isolata (17), essendo il suo impiego come test di screening limitato soprattutto da un altissimo tasso di falsi positivi.

Data l'evidenza che la cardiogenesi è completa entro il primo trimestre di gestazione, e che i geni responsabili del processo di formazione del cuore e dei grandi vasi devono quindi risultare a quest'epoca totalmente espressi, è ragionevole pensare che, confrontando il profilo di espressione dei geni di derivazione placentare di feti sani con quello di feti affetti da cardiopatia congenita isolata, sia possibile giungere alla identificazione di markers molecolari così da sviluppare un approccio di stratificazione delle gravidanze in base al rischio di CHD.

L'evidenza che le anomalie nel processo di angiogenesi placentare condividono caratteristiche patogenetiche con le anomalie nel processo di morfogenesi cardiaca ha aperto una finestra sulla ricerca di possibili mutazioni di geni candidati espressi nel tessuto placentare e potenzialmente utilizzabili come biomarkers rintracciabili nel sangue materno. Un paper risalente al 2006 (18) ha osservato come, in campioni di tessuto prelevato dai villi coriali di feti euploidi con aumentata traslucenza nucale, ad una età gestazionale compresa tra 10 e 11 settimane, fosse rintracciabile un pattern genetico sotto-espresso relativamente a geni con probabile origine dal core

mesenchimale dei villi coriali. In considerazione dell'origine di questi ultimi dal mesoderma extraembrionale, è lecito ipotizzare tale pattern di espressione anomala come strettamente rappresentativo del profilo genetico embrionale.

Successivamente, in uno studio condotto sempre a Bologna nel 2010 (19) si sono identificati specifici geni di origine placentare caratterizzati da espressione aberrante. L'analisi è stata condotta su campioni di tessuto placentare ottenuti nell'immediato post-partum di feti con diagnosi prenatale di cardiopatia congenita isolata. Contestualmente, lo studio ha confermato la presenza di disregolazione nel pattern di espressione di selezionati geni nel sangue materno di pazienti gravide portatrici di feto singolo euploide affetto da CHD durante il secondo trimestre. Si è quindi confermata l'ipotesi secondo cui il tessuto placentare derivante da feti affetti, prelevato dopo il secondamento, esprime effettivamente un profilo genico aberrante per quanto riguarda i geni coinvolti nella cardiogenesi. Si sono in particolare individuate quattro categorie funzionali di geni verosimilmente coinvolti nell'alterato sviluppo del cuore e dei grandi vasi:

- morfogenesi cardiaca (tenascin, TXN, SAV1);
- biosintesi della matrice extracellulare e del tessuto valvolare (PAPP-A, COL1A2, fibulin-1, heparanase, Jumonji, P4HA2);
- contrattilità (ACTN4, FSCN1, MAP4);
- scompenso cardiaco congestizio (endothelin-3, MYL7).

Lo studio ha infine suggerito che il profilo alterato rilevato a livello placentare possa essere, almeno parzialmente, riscontrabile da una parte a livello dei villi coriali prelevati tramite tecniche di diagnostica invasiva (villocentesi), dall'altra nella circolazione sistemica della paziente gravida come risultato del passaggio in circolo degli elementi trofoblastici.

Sulla base delle evidenze attualmente disponibili, in conclusione, si è pervenuti a ipotizzare che il mesoderma extraembrionale (da cui deriva l'asse mesenchimale dei villi) e il mesoderma embrionale (substrato da cui originano, oltre al cuore, altri organi inclusi derma, cartilagini e ossa, reni e milza) abbiano un'origine simile. Verosimilmente, quindi, il tessuto dei villi coriali esprime un pattern genetico specifico che è con buona approssimazione sovrapponibile a quello espresso dagli organi embrionali derivanti dal mesoderma, e in primis dal cuore fetale. Tale premessa implica, sulla base di un intuitivo trasferimento commutativo, che nel momento in cui una cardiopatia congenita esprime uno specifico pattern genetico aberrante, il medesimo insieme di anomalie genetiche si ritroverà anche nelle cellule del core centrale dei villi.

In ultima analisi, pertanto, isolando nel sangue materno acidi nucleici di origine placentare, e studiando a questo livello pattern di geni con alterata espressione, si ritroverà un quadro sovrapponibile al pattern aberrante espresso a livello del cuore embrionale con difetto della

morfogenesi. Questa la base su cui costruire una metodica indiretta e non invasiva tesa ad analizzare pattern genetici espressi a livello del cuore in via di sviluppo come potenziali predittori di lesioni cardiache congenite.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'*obiettivo primario* dello studio è creare un algoritmo di screening delle cardiopatie congenite basato sull'espressione di un pool di mRNA placentari circolanti nel sangue materno (specifici della cardiogenesi e/o del controllo della funzionalità cardiaca). L'*obiettivo secondario* dello studio è individuare pattern di espressione specifici per determinate tipologie di CHD.

Tali obiettivi sono stati raggiunti mediante l'utilizzo di una nuova metodica di laboratorio, la *tecnologia Nanostring*. Questa tecnologia è una metodica di rilevamento digitale in grado di eseguire un profiling diretto delle molecole di acido nucleico target in un'unica reazione, senza bisogno di retrotrascrizione e amplificazione, e con un elevatissimo grado di multiplex. In questo modo è possibile ottenere dati fedeli e affidabili non influenzati da alcun tipo di bias, inevitabilmente introdotto dalle reazioni enzimatiche. L'analisi mediante Real Time PCR dei geni risultati positivi allo screening su piattaforma Nanostring ha consentito la validazione di un numero ristretto di geni. Questi ultimi potrebbero costituire la base per produrre un kit diagnostico teso allo sviluppo futuro di un test di screening su sangue materno non invasivo, a costi contenuti, in grado di restituire uno score di rischio affidabile per lo sviluppo di cardiopatie congenite.

MATERIALI E METODI

E' stato condotto uno studio prospettico di coorte, monocentrico, che ha incluso gravidanze singole complicate da cardiopatia fetale ecograficamente diagnosticata (gruppo A), appaiate per epoca gestazionale con gravidanze a decorso fisiologico (gruppo B). I criteri di esclusione, comuni a entrambi i gruppi, sono stati: gemellarità, positività allo screening per malattie infettive, la presenza di aneuploidie fetali accertate, di malformazioni multiple e/o di gravi patologie della gravidanza e l'età materna inferiore a 18 anni.

Il reclutamento delle pazienti è avvenuto presso gli ambulatori dell'U.O. di Ostetricia e di Medicina dell'Età Prenatale, Policlinico Sant'orsola-Malpighi. Tutte le procedure di laboratorio sono state effettuate presso le sedi di Geneticlab srl di Noventa Vicentina e Pordenone. In particolare, presso il laboratorio di Noventa Vicentina (VI) sono stati accentrati i campioni biologici, estratti gli acidi nucleici fetali e distrutti i campioni biologici. Gli mRNA sono stati invece analizzati presso la struttura di Pordenone su piattaforma Nanostring in grado di valutare simultaneamente i 132 marcatori d'interesse. L'espressione di RNA fetali su piattaforma Nanostring è stata interpolata con algoritmi in grado di restituire indici di rischio coerenti. Infine, i risultati ottenuti dalle analisi su piattaforma Nanostring sono stati validati mediante tecnica di retrotrascrizione e Real Time PCR.

3.1 Modalità di prelievo del tessuto umano

Il prelievo di sangue venoso materno è stato eseguito direttamente dagli sperimentatori, di cui è stata cura raccogliere informazioni relative agli esiti neonatali a 30-60 giorni dal parto. Il sangue, per un volume di 5+5 ml, è stato raccolto in due provette sterili del tipo vacutainer (Safe-Tube 2-IVD marcato CE, Geneticlab, Italia). Il dispositivo medico include un additivo brevettato, contenente tra l'altro K3EDTA, per la conservazione e la stabilizzazione di RNA libero circolante nel sangue intero di derivazione umana. Alle provette è stato assegnato un numero di codifica unica (anonimizzazione del campione) ed esse sono state trattate immediatamente ed integralmente (Cfr. 3.4), per l'estrazione degli acidi nucleici fetali di interesse.

3.2 Procedure di laboratorio

Gli mRNA sono stati invece analizzati presso la struttura di Pordenone su piattaforma Nanostring in grado di valutare simultaneamente i 132 marcatori d'interesse. L'espressione di RNA fetali su piattaforma Nanostring è stata interpolata con algoritmi in grado di restituire indici di rischio coerenti. Infine, i risultati ottenuti dalle analisi su piattaforma Nanostring sono stati validati

mediante tecnica di retrotrascrizione e Real Time PCR.

La tecnologia Nanostring è una metodica di rilevamento digitale in grado di eseguire un profiling diretto delle molecole di acido nucleico target in un'unica reazione, senza bisogno di retrotrascrizione e amplificazione, e con un elevatissimo grado di multiplex. In questo modo è possibile ottenere dati fedeli e affidabili non influenzati da alcun tipo di bias, inevitabilmente introdotto dalle reazioni enzimatiche. I campioni di sangue, codificati mediante sigla alfanumerica, sono stati sottoposti a procedure volte dapprima alla separazione del plasma dalla frazione cellulare, quindi all'estrazione e purificazione dell'RNA totale tramite RiboPure Kit AMBION in entrambe le frazioni. I 132 target d'interesse, di seguito riportati, sono stati quindi analizzati simultaneamente (Tabella 2).

Tabella 2: geni target d'interesse

Official symbol	Official full name
ABCA9	ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY A (ABC1), MEMBER 9
ACRV1	ACROSOMAL VESICLE PROTEIN 1
ACTN4	ACTININ, ALPHA 4
AFF4	AF4/FMR2 FAMILY, MEMBER 4
AGXT2	ALANINE-GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 2
ARF1	ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1
ARV1	ARV1 HOMOLOG (YEAST)
ATF1	ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR 1
C14ORF32	CHROMOSOME 14 OPEN READING FRAME 32
C20ORF58	CHROMOSOME 20 OPEN READING FRAME 58
C3ORF26	CHROMOSOME 3 OPEN READING FRAME 26
C6ORF1	CHROMOSOME 6 OPEN READING FRAME 1
C9ORF75	CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 75
C9ORF78	HYPOTHETICAL PROTEIN HSPC220
CDK5RAP1	HYPOTHETICAL PROTEIN HSPC167
CENTG2	CENTAURIN, GAMMA 2
CHST10	CARBOHYDRATE SULFOTRANSFERASE 10
CHST11	CARBOHYDRATE (CHONDROITIN 4) SULFOTRANSFERASE 11
CLASP2	CYTOPLASMIC LINKER ASSOCIATED PROTEIN 2
CLEC9A	C-TYPE LECTIN DOMAIN FAMILY 9, MEMBER A
CLIPR-59	CLIP-170-RELATED PROTEIN
COL1A2	COLLAGEN, TYPE I, ALPHA 2
CPB1	CARBOXYPEPTIDASE B1 (TISSUE)
CSF1R	COLONY STIMULATING FACTOR 1 RECEPTOR, FORMERLY MCDONOUGH FELINE SARCOMA VIRAL (V-FMS) ONCOGENE HOMOLOG

CSNK2B	CASEIN KINASE 2, BETA POLYPEPTIDE
CTNND2	CATENIN (CADHERIN-ASSOCIATED PROTEIN), DELTA 2 (NEURAL PLAKOPHILIN-RELATED ARM-REPEAT PROTEIN)
DNAJA1	DNAJ (HSP40) HOMOLOG, SUBFAMILY A, MEMBER 1
DND1	DEAD END HOMOLOG 1 (ZEBRAFISH)
DPH2	DPH2 HOMOLOG (S. CEREVISIAE)
DPP8	DIPEPTIDYL-PEPTIDASE 8
DUSP10	DUAL SPECIFICITY PHOSPHATASE 10
EDN3	ENDOTHELIN 3
ENPP1	ECTONUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE/PHOSPHODIESTERASE 1
FALZ	FETAL ALZHEIMER ANTIGEN
FAM53B	FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 53, MEMBER B
FAM73A	FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 73, MEMBER A
FAT4	FAT TUMOR SUPPRESSOR HOMOLOG 4 (DROSOPHILA)
FBLN1	FIBULIN 1
FBXO31	F-BOX PROTEIN 31
FGG	FIBRINOGEN GAMMA CHAIN
FLJ14082	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ14082
FLJ23657	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ23657
FLJ33387	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ33387
FLJ34969	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ34969
FLJ37562	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ37562
FSCN1	FASCIN HOMOLOG 1, ACTIN-BUNDLING PROTEIN (STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS)
G3BP2	RAS-GTPASE ACTIVATING PROTEIN SH3 DOMAIN-BINDING PROTEIN 2
GNAO1	GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN (G PROTEIN), ALPHA ACTIVATING ACTIVITY POLYPEPTIDE O
GNRH1	GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE 1 (LUTEINIZING-RELEASING HORMONE)
GPX3	GLUTATHIONE PEROXIDASE 3 (PLASMA)
GSR	GLUTATHIONE REDUCTASE
GTPBP1	GTP BINDING PROTEIN 1
HCFC1	HOST CELL FACTOR C1 (VP16-ACCESSORY PROTEIN)
HDAC5	HISTONE DEACETYLASE 5
HPSE	HEPARANASE
HSPC065	HSPC065 PROTEIN
IQGAP1	IQ MOTIF CONTAINING GTPASE ACTIVATING PROTEIN 1
JARID1B	JUMONJI, AT RICH INTERACTIVE DOMAIN 1B (RBP2-LIKE)
KCNV1	POTASSIUM CHANNEL, SUBFAMILY V, MEMBER 1
KRAS	V-HA-RAS HARVEY RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
LAMB2	LAMININ, BETA 2 (LAMININ S)
LASP1	LIM AND SH3 PROTEIN 1

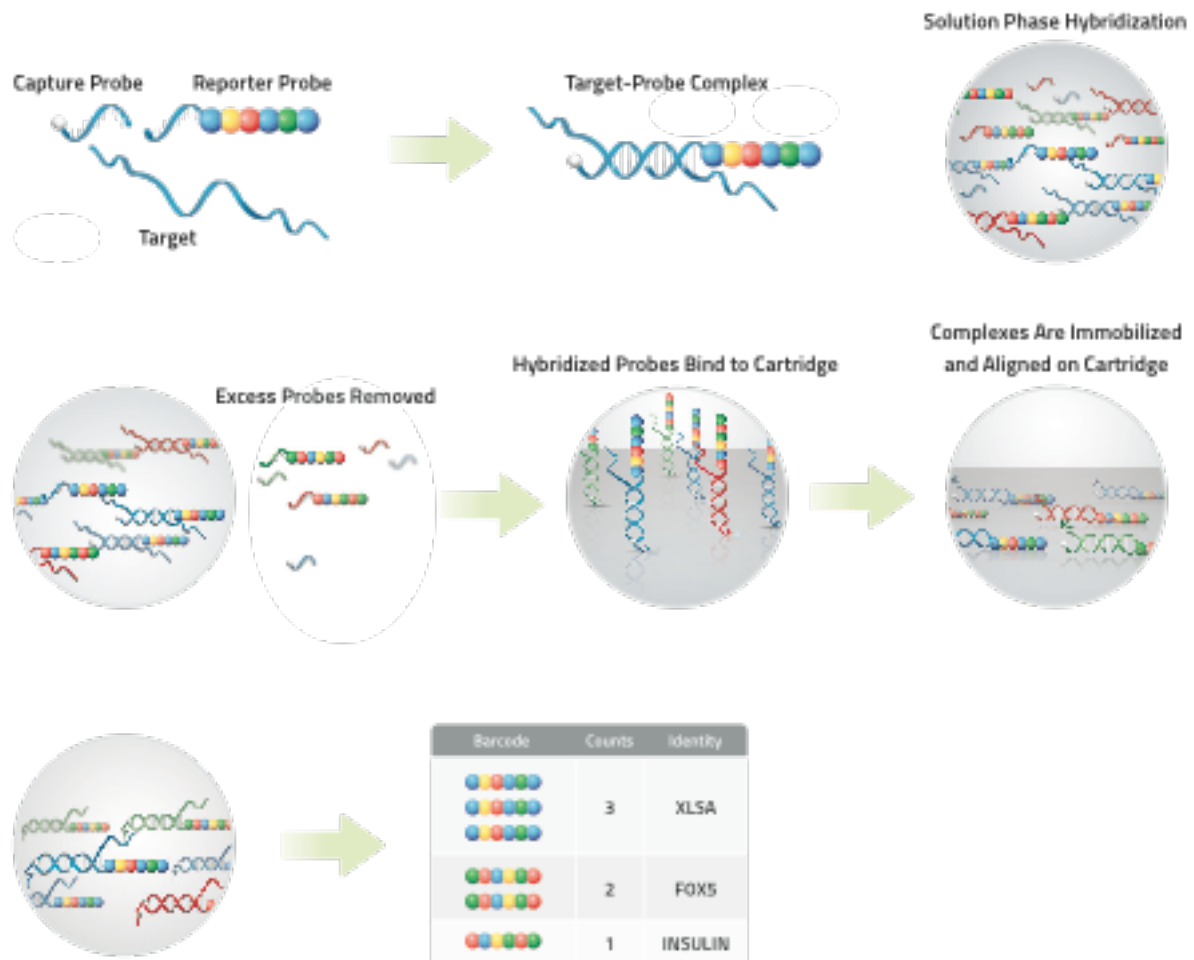
LOC150759 HYPOTHETICAL PROTEIN LOC150759
LOC387647 HYPOTHETICAL GENE SUPPORTED BY BC014163
LOC388559 SIMILAR TO ZINC FINGER PROTEIN 600
LOC90826 HYPOTHETICAL PROTEIN BC004337
LPHN3 LATROPHILIN 3
LRBA LPS-RESPONSIVE VESICLE TRAFFICKING, BEACH AND ANCHOR CONTAINING
LRRC58 LEUCINE RICH REPEAT CONTAINING 58
MAML2 MASTERMIND-LIKE 2 (DROSOPHILA)
MAP4 MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4
MAP6 MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 6
MAPK8IP1 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 8 INTERACTING PROTEIN 1
MARCKS MYRISTOYLATED ALANINE-RICH PROTEIN KINASE C SUBSTRATE
MGC16275 HYPOTHETICAL PROTEIN MGC16275
MICAL-L2 MICAL-LIKE 2
MLL MYELOID/LYMPHOID OR MIXED-LINEAGE LEUKEMIA (TRITHORAX HOMOLOG, DROSOPHILA)
MMP2 MATRIX METALLOPEPTIDASE 2 (GELATINASE A, 72KDA GELATINASE, 72KDA TYPE IV COLLAGENASE)
MYL7 MYOSIN, LIGHT POLYPEPTIDE 7, REGULATORY
NCAM2 NEURAL CELL ADHESION MOLECULE 2
NDUFV2 NADH DEHYDROGENASE (UBIQUINONE) FLAVOPROTEIN 2, 24KDA
NOTCH2NL NOTCH HOMOLOG 2 (DROSOPHILA) N-TERMINAL LIKE
P2RY14 PURINERGIC RECEPTOR P2Y, G-PROTEIN COUPLED, 14
P4HA2 PROCOLLAGEN-PROLINE, 2-OXOGLUTARATE 4-DIOXYGENASE (PROLINE 4-HYDROXYLASE), ALPHA POLYPEPTIDE II
PAPPA PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN A, PAPPALYSIN 1
PBEF1 PRE-B-CELL COLONY ENHANCING FACTOR 1
PRICKLE1 PRICKLE-LIKE 1 (DROSOPHILA)
PRKACB PROTEIN KINASE, CAMP-DEPENDENT, CATALYTIC, BETA
PRKCD PROTEIN KINASE C, DELTA
PSMD14 PROTEASOME (PROSOME, MACROPAIN) 26S SUBUNIT, NON-ATPASE, 14
PSMF1 PROTEASOME (PROSOME, MACROPAIN) INHIBITOR SUBUNIT 1 (PI31)
PTPDC1 PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE DOMAIN CONTAINING 1
PUS1 PSEUDOURIDYLATE SYNTHASE 1
RAB36 RAB36, MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY
RAB3GAP1 RAB3 GTPASE ACTIVATING PROTEIN SUBUNIT 1 (CATALYTIC)
RIOK3 RIO KINASE 3 (YEAST)
RNH1 RIBONUCLEASE/ANGIOGENIN INHIBITOR 1
RORA RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR A
SAP30 SIN3A-ASSOCIATED PROTEIN, 30KDA
SAV1 SALVADOR HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)

SCN2B	SODIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, TYPE II, BETA
SDC4	SYNDECAN 4 (AMPHIGLYCAN, RYUDOCAN)
SEC63	SEC63-LIKE (S. CEREVISIAE)
SEMA5A	SEMA DOMAIN, SEVEN THROMBOSPONDIN REPEATS (TYPE 1 AND TYPE 1-LIKE), TRANSMEMBRANE DOMAIN (TM) AND SHORT CYTOPLASMIC DOMAIN, (SEMAPHORIN) 5A
SH3GLB1	SH3-DOMAIN GRB2-LIKE ENDOPHILIN B1
SLC35E3	SOLUTE CARRIER FAMILY 35, MEMBER E3
SLC7A6OS	SOLUTE CARRIER FAMILY 7, MEMBER 6 OPPOSITE STRAND
SNAP29	SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATED PROTEIN, 29KDA
SND1	STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE DOMAIN CONTAINING 1
SPARCL1	SPARC-LIKE 1 (MAST9, HEVIN)
SPRY1	SPROUTY HOMOLOG 1, ANTAGONIST OF FGF SIGNALING (DROSOPHILA)
STAM	SIGNAL TRANSDUCING ADAPTOR MOLECULE (SH3 DOMAIN AND ITAM MOTIF) 1
STARD8	START DOMAIN CONTAINING 8
STK4	SERINE/THREONINE KINASE 4
STX7	SYNTAXIN 7
TBC1D22A	TBC1 DOMAIN FAMILY, MEMBER 22A
TNXB	TENASCIN XB
TRAPPC1	TRAFFICKING PROTEIN PARTICLE COMPLEX 1
TRPM7	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, SUBFAMILY M, MEMBER 7
TSHZ2	CHROMOSOME 20 OPEN READING FRAME 17
TXN	THIOREDOXIN
USP38	UBIQUITIN SPECIFIC PEPTIDASE 38
VPS13D	KIAA0453 PROTEIN
WDFY1	WD REPEAT AND FYVE DOMAIN CONTAINING 1
WIZ	WIDELY-INTERSPACED ZINC FINGER MOTIFS
WWOX	PUTATIVE OXIDOREDUCTASE
ZNF138	ZINC FINGER PROTEIN 138
ZNF294	ZINC FINGER PROTEIN 294
ZNF700	ZINC FINGER PROTEIN 700
ZNF720	ZINC FINGER PROTEIN 720
ZNF9	ZINC FINGER PROTEIN 9 (A CELLULAR RETROVIRAL NUCLEIC ACID BINDING PROTEIN)
ZYG11B	ZYG-11 HOMOLOG B (C. ELEGANS)

Il principio della metodica si basa sulla marcatura di ogni molecola target con color coded-barcode unico. La marcatura è resa possibile dall'ibridizzazione delle molecole di acido nucleico con sonde specifiche e dal successivo spottaggio su fase solida nella specifica cartuccia di analisi.

Grazie all'elevato grado di automazione, il workflow è altamente semplificato e richiede un intervento minimo da parte dell'operatore, massimizzando la performance del sistema e riducendo al minimo la possibilità di errore. Con l'utilizzo di Nanostring è possibile rilevare e quantificare direttamente le molecole di RNA target sfruttando due sonde ("capture probe" e "reporter probe"), complementari alle molecole di RNA d'interesse. Il "capture probe" ha una lunghezza di circa 50 nucleotidi ed è biotinilato per consentire la successiva immobilizzazione ed allineamento del complesso sonda-RNA target. Il "reporter probe" (anch'esso pari a una lunghezza di circa 50 nucleotidi) è disegnato in modo contiguo rispetto al "capture probe" e comprende un tag di fluorofori ("molecular barcodes") unico che permette l'identificazione del target. L'insieme dei "capture probes" e "reporter probes" per i geni d'interesse è chiamato "CodeSet". Il "Code Set" viene quindi ibridizzato all'RNA, e le sonde in eccesso lavate via. A questo punto i complessi «capture probe + RNA target + reporter probe» sono immobilizzati sulla superficie di un cartuccia ricoperta di streptavidina (mediante interazione biotina-streptavidina) e allineati elettroforicamente. I barcodes molecolari sono poi rilevati e contati mediante uno scanner digitale a fluorescenza; il numero di conte di ogni specifico barcode corrisponde al numero di molecole dei trascritti d'interesse.

Figura 2. Schema illustrativo del workflow in tre fasi (ibridazione; purificazione e immobilizzazione; raccolta dati) del protocollo Nanostring con nCounter (20)



I dati così ottenuti sono infine stati validati tramite retrotrascrizione e Real Time PCR. Le reazioni di retrotrascrizione per la sintesi di cDNA sono effettuate su RNA totale, estratto da leucociti o plasma, seguendo lo schema two steps: dapprima, cioè, si effettua la procedura di retrotrascrizione indipendente; in un secondo momento, aliquote di cDNA vengono usate per le reazioni di Real Time PCR. In breve, cDNA è prodotto a partire da 0,5-0,10 microgrammi di RNA totale per ogni campione in presenza di primer oligonucleotidici casuali (random hexamers) e dell'enzima MultiScribe™ — una trascrittasi inversa sintetica. Ogni campione di cDNA è sottoposto a PCR in duplicato o triplicato per assicurare la buona riproducibilità sperimentale e valutare la deviazione standard.

L'analisi mediante Real Time PCR dei geni risultati positivi allo screening su piattaforma Nanostring ha consentito la validazione di un numero ristretto di geni. Questi ultimi costituiscono la base per produrre un kit diagnostico teso allo sviluppo futuro di un test di screening su sangue materno non invasivo, a costi contenuti, in grado di restituire uno score di rischio affidabile per lo sviluppo di cardiopatie congenite.

3.3 Analisi dei risultati di laboratorio

Le conte grezze dei geni endogeni sono state normalizzate utilizzando diversi fattori di correzione e il valore di background, per i quali NanoString fornisce un software di calcolo (nSolver™) o, in alternativa, le indicazioni di calcolo manuale. I fattori di correzione comprendono: il fattore di correzione per i controlli interni positivi (positive controls); il background, calcolato sui controlli interni negativi (negative controls); il fattore di correzione calcolato sui geni housekeeping (geni che vengono attivamente trascritti e tradotti a un livello relativamente elevato, che generalmente codificano proteine ed enzimi fondamentali per la vita della cellula e che, pertanto, devono essere sempre presenti).

Il segnale di PCR dei trascritti target è stato espresso ricorrendo al metodo 2⁻ (DDCt) (21), che risulta particolarmente indicato per analizzare cambiamenti relativi dell'espressione genica in un gruppo di pazienti affetti rispetto ai controlli sani. Nello specifico, valori aumentati di 2⁻(DDCt) corrispondono ad un aumento dell'espressione dello specifico gene nel campione considerato rispetto ai controlli.

Previa conversione in scala Log₁₀, i dati normalizzati sono stati prima analizzati con test parametrici (dopo verifica della normale distribuzione dei dati secondo Kolmogorov-Smirnov: p-value>0.05). L'analisi multivariata è stata condotta mediante analisi lineare discriminante (LDA) usando la specie di mRNA target quale predittore indipendente di cardiopatia. Nella curva ROC infine generata, questa coincide con la variabile esplicativa.

RISULTATI

Tra Gennaio 2014 e settembre 2016, sono state reclutate 79 pazienti con gravidanza singola complicata da CHD (gruppo A) e 44 pazienti con gravidanza singola a decorso fisiologico (gruppo B), oltre a 30 controlli sani non gravidi. I casi reclutati hanno incluso sei categorie di CHD: anomalie cono-truncali (n=8), quadri ostruttivi dell'outflow sinistro (n=10), difetti delle valvole cardiache (n=5), difetti settali (n=3), anomalie del cuore destro o sinistro (n=5), e anomalie del ritmo cardiaco (n=2). In sei casi, la malformazione cardiaca era complessa.

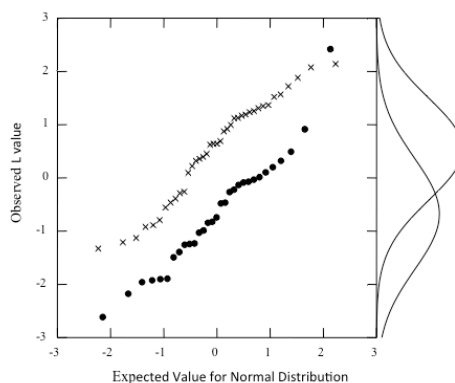
Riguardo all'obiettivo primario dello studio, i risultati dell'analisi eseguita con tecnologia Nanostring confrontando donne gravide e donne non gravide, sono riportati in Tabella 3. Per quanto riguarda i gruppi d'interesse, sono stati individuati sei geni con espressione aberrante: FALZ, PAPP-A, PRKACB, SAV1, STK4 e TNXB2. Il gene housekeeping selezionato è stato FALZ, la cui espressione si è dimostrata la più costante tra i due gruppi. In base alle conoscenze attuali, d'altronde, il gene FALZ non è mai stato ricollegato alle cardiopatie.

Tabella 3: lista dei geni con differente conta genica (donne gravide versus donne non gravide)

Nome intero ufficiale	Simbolo ufficiale
Bromodomain PHD finger transcription factor	BPTF
Fetal Alzheimer antigen	FALZ
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	NDUFV2
Pregnancy-associated plasma protein-A	PAPP-A
Protein kinase C, alpha	PRKACB
Sema domain, Seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), Transmembrane domain (TM) and Short cytoplasmic domain (semaphorin) 5A	SEMA5A
SH3-domain GRB2-like endophilin B1	SH3GLB1
SPARC-like 1 (hevin)	SPARCL1
Serine/threonine kinase 4	STK4
Tenascin XB2	TNXB2
WD repeat and FYVE domain containing 1	WDFY1

Questi sei geni sono stati successivamente studiati mediante Real Time PCR. Nessuna differenza in termini di espressione di mRNA è stata osservata, ad eccezione di SAV1 nel gruppo delle cardiopatie ($R^2 = 0.134$ p-value = 0.026) e di PAPP-A nel gruppo di controllo ($R^2 = 0.155$, p-value = 0.029) (Figura 3).

Figura 3: P-plot dei valori discriminanti nei casi (X) e nei controlli (•). Sulla sinistra del grafico, sono riportate le distribuzioni Gaussiane corrispondenti



La Tabella 4 mostra i dati normalizzati per entrambi i gruppi (Test di Kolmogorov-Smirnov). Tutte le specie di mRNA considerate in questo studio ad eccezione di PAPP-A hanno presentato un significativo grado di aberrazione di espressione. Il Test di Levene per l'omogeneità della varianza ha ottenuto un p-value < 0.05 per SAV1, TNXB2 e PRKACB, e un p-value di 0.14 per STK4.

Table 4: $2^{-\Delta\Delta CT}$ delle specie di mRNA e score di discriminazione (media \pm DS) nei casi e nei controlli

mRNA species	Controlli (n=31)	Casi (n=39)	p-value*	Bootstrap**
SAV1	-0.1365 \pm 1.61	0.7112 \pm 1.11	0.012	0.023
PAPPA-A	-0.2594 \pm 1.34	0.0579 \pm 1.71	0.402	0.395
TNXB2	-0.0979 \pm 1.35	1.0201 \pm 1.80	0.006	0.005
STK4	-0.1272 \pm 0.49	0.2818 \pm 0.32	<0.001	0.001
PRKACB	-0.1232 \pm 0.95	0.4248 \pm 0.59	0.005	0.006
Discriminant Score (L)	-0.67 \pm 1.04	0.54 \pm 0.96	<0.0001	0.001

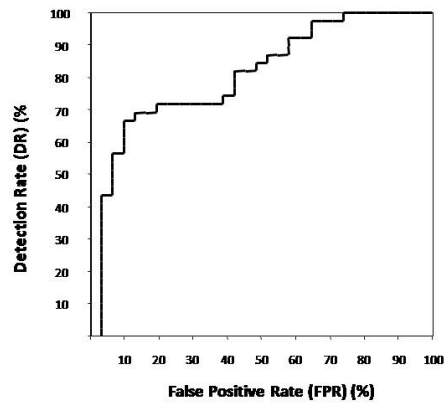
*Student t-test; **su 1000 casi

Nella Tabella 5 sono riportate le aree sotto a curva (AUC) con le relative detection rate (DR) a un tasso di falsi positivi del 10% per ciascuno mRNA considerato. La DR è risultata pari a 66,7% con un potere del 100% (errore di Tipo I del 5%) (Figura 4). Un alto score di discriminazione (>75th centile) è stato ottenuto in 14 casi di CHD (82,4%) e in un solo controllo (5,8%), così come due casi di anomalie del ritmo cardiaco (11,8%).

Tabella 5: curva ROC e DR delle specie di mRNA considerate nello studio

Specie di mRNA	AUC	SE	p-value	95% CI		DR
PAPP-A	0.503	0.070	0.967	0.366	0.639	17.9
PRKACB	0.665	0.069	0.018	0.530	0.800	17.9
SAV1	0.711	0.064	0.003	0.586	0.837	28.2
STK4	0.804	0.054	<0.001	0.698	0.909	41.0
TNXB2	0.662	0.065	0.021	0.534	0.790	33.3
PRKACB, SAV1, STK4, TNXB2	0.810	0.052	<0.001	0.707	0.913	66.7

Figura 4: Curva ROC multivariata



Riguardo all'obiettivo secondario dello studio, l'analisi è stata eseguita per i quadri ostruttivi dell'outflow sinistro in forma isolata (n=9), appaiati per epoca gestazionale con 10 gravidanze fisiologiche e 5 controlli negativi non gravidi (Tabella 6).

Tabella 6: Pazienti con gravidanza singola a decorso fisiologico e diagnosi prenatale ecografica di LVOT

	<i>ID</i>	<i>Diagnosi ecografica</i>	<i>SG</i>	<i>Età</i>
LVOT1	65CR	HLHS (acinesia e fibroelastosi ventricolare; atresia delle valvole aortica e mitralica; riduzione di calibro di istmo, arco trasverso e aorta discendente).	22+2	41
LVOT2	66CG	Stenosi sopraaortica.	20+5	36
LVOT3	70CJ	Coartazione istmica dell'aorta con succlavia lusoria.	22+6	36
LVOT4	GF	HLHS (ipoplasia aortica; atresia valvolare mitralica e aortica; ventricolo riduttivo).	22+1	29
LVOT5	75FM	Coartazione istmica dell'aorta su lieve prevalenza delle sezioni destre; anulus nei limiti della norma.	23+6	35
LVOT6	82HY	Coartazione aortica su moderata prevalenza delle sezioni destre.	22+4	37
LVOT7	81CV	Sindrome del cuore sinistro ipoplasico (stenosi valvolare aortica; coartazione istmica; ventricolo riduttivo).	20+1	29
LVOT8	ACM	Interruzione dell'arco aortico.	20+6	27
LVOT9	2RM	Coartazione aortica su arco ipoplasico destroposto.	23+6	36

I risultati ottenuti con tecnologia Nanostring, condotta in tre tempi su batterie differenziate (novembre 2014, maggio 2016, settembre 2016), hanno permesso l'identificazione di un pool di 8 geni con profilo di espressione aberrante: ARF1, DPP8, PRKCD, PSMF1, SAP30, SH3GLB1, SND1 e STK4. Tali dati preliminari hanno permesso di stabilire che alcuni fra i geni sopra menzionati hanno capacità discriminante selettiva per le anomalie del cono tronco e i quadri ostruttivi dell'outflow sinistro.

Tabella 7. Dati normalizzati relativi alle 8 specie di geni con profilo di espressione aberrante (LVOT vs Ctrl)

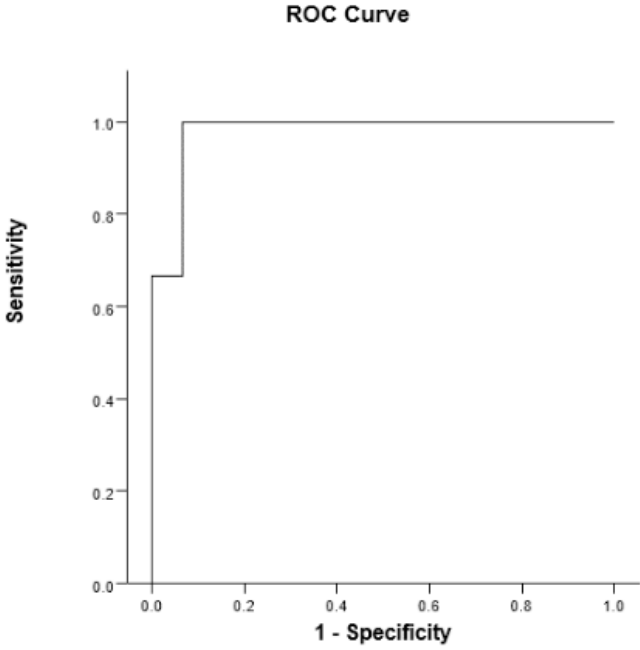
	ID	ARF1	DPP8	PRKCD	PSMF1	SH3GLB1	SND1	STK4
LVOT1	65CR	497.26	0	0	1294	3.44	36.13	13.03
LVOT2	66CG	541.05	8.59	0	2333.74	19.09	51.65	26.45
LVOT3	70CJ	404.45	0	0	761.71	24.5	23.08	0.4
LVOT4	FG Torino	26.42	1.83	0	35.03	11.67	0	7.98
LVOT5	75FM	23.01	1.52	1.52	68.75	1.52	1.52	3.18
LVOT6	82HY	35.02	5.88	1.08	82.5	15.59	5.88	20.99
LVOT7	81CV	75.03	7.16	5.36	52.91	27.49	4.77	41.54
LVOT8	ACM	193.22	53.34	14.09	925.78	66.43	14.09	52.34
LVOT9	2RM	46.37	0	0	31.75	26.44	0	6.5
ctrl1	C71423	39.32	0	0	12.91	6.69	0	14.46
ctrl2	C126923	34.51	1.71	1	26.07	18.58	7.33	26.07
ctrl3	C126924	53.33	2.07	1.51	20.16	17.15	1.51	26.19
ctrl4	C126925	45.29	7.49	1	4.85	22.43	2.21	28.58
ctrl5	C126926	81.37	5.36	4.4	31.23	19.41	6.32	45.28
ctrl6	CP68	33.99	0	0	46.37	12.1	0	0
ctrl7	CP69	53.65	0	0	121.84	20.04	0	5.63
ctrl8	CP70	18.61	0	0	65.72	0	0	0
ctrl9	CP72	82.59	0	0	213.09	36.25	0	0.88
ctrl10	CP73	58.02	2.7	0	95.24	20.81	0	19.8
ctrl11	CP35	72.92	2.86	3.78	68.31	49.87	0	36.05
ctrl12	CP76	6.9	0	0	90.15	7.84	0	0
ctrl13	CP77	32.4	4.07	0	84.17	25.56	0	23.61
ctrl14	CP79	19.78	0	0	54.12	6.43	0	7.38
ctrl15	CP81	3.58	0	0	20.58	0	0	0

Tabella 8-9. Analisi statistica relativa alle 8 specie di geni con profilo di espressione aberrante (LVOT vs Ctrl)

		ARF1	DPP8	PRKCD	PSMF1	SAP30	SH3GLB1	SND1	STK4
Ctrl	Mediana	39.32	0	53.52	0	0	0	0	0
	Media	42.14	1.1	57.25	6.34	0.48	5.61	1.15	9.37
	Min.	3.71	0	0	0	0	0	0	0
	Max.	81.71	7.49	210.91	31.23	3.77	22.43	7.33	45.28
	Dev. standard	24.69	2.29	58.45	10.84	1.03	8.82	2.4	14.93
LVOT	Mediana	75.03	1.83	1.08	82.5	1.52	15.59	5.88	13.03
	Media	204.59	8.59	5.93	617.15	2.82	18.85	15.23	18.43
	Min.	23.01	0	0	0	0	0	0	0
	Max.	541.05	52.34	31.39	2333.74	14.09	66.43	51.65	52.34
	Dev. standard	216.32	16.73	10.59	802	4.64	20.38	18.28	18.67
Totale	Mediana	45.57	0	9.72	8.88	0	2.48	0	1.79
	Media	103.06	3.91	38	235.4	1.36	10.58	6.43	12.77
	Min.	3.71	0	0	0	0	0	0	0
	Max.	541.05	52.34	210.91	2333.74	14.09	66.43	51.65	52.34
	Dev. standard	151.99	10.69	52.56	561.28	3.07	15.32	12.97	16.65

	ARF1	DPP8	PRKCD	PSMF1	SAP30	SH3GLB1	SND1	STK4
Mann-Whitney U	38.000	37.500	25.000	10.000	41.000	30.000	26.000	37.000
Wilcoxon W	158.000	157.500	70.000	130.000	161.000	150.000	146.000	157.000
Z	-1.759	-1.997	-2.546	-3.605	-1.817	-2.351	-2.697	-1.912
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.079	0.046	0.011	0.000	0.069	0.019	0.007	0.056
Exact Sig. (2-tailed)	0.084	0.046	0.009	0.000	0.074	0.018	0.006	0.059
Exact Sig. (1-tailed)	0.042	0.027	0.005	0.000	0.036	0.010	0.004	0.031
Point probability	0.005	0.004	0.000	0.000	0.003	0.002	0.001	0.004

Figura 5. Curva Receiver Operating Characteristic (ROC)



DISCUSSIONE

I risultati del presente studio dimostrano che in caso di CHD l'espressione di alcuni mRNA placentari circolanti nel sangue materno durante il secondo trimestre di gravidanza è aberrante, se confrontata con gravidanze a decorso fisiologico alla stessa epoca gestazionale. In particolare, si è validata l'abilità discriminante di SAV1 e TNXB2, che era già stata dimostrata precedentemente (19), e inoltre sono state individuate nuove specie di mRNA, come STK4 e PRKACB. E' stata, inoltre, trovata una forte associazione tra i pannelli di mRNA e i quadri ostruttivi dell'outflow sinistro e le anomalie conotruncali. Sulla base dell'analisi Nanostring, otto geni hanno presentato profilo di espressione aberrante: ARF1, DPP8, PRKCD, PSMF1, SAP30, SH3GLB1, SND1 e STK4.

Tenascin XB regola sia la struttura sia la stabilità delle fibre elastiche e, inoltre, organizza le fibrille di collagene nella matrice extracellulare (ECM), incidendo sulla rigidità o sulla elasticità dei tessuti. Esso svolge un ruolo importante nello sviluppo cardiaco, dal momento che viene espressa durante la fase di migrazione delle cellule dell'epicardio e delle cellule progenitrici delle valvole (19), così come si associa alla vasculogenesi coronarica. Inoltre, la carenza di TNXB2 è stata associata alla sindrome di Ehlers-Danlos, una patologia tipica del connettivo.

La proteina codificata dal gene *Salvador omologo 1* è ubiquitariamente espressa negli adulti, ma la sua massima espressione è nel setto interventricolare fetale. A oggi, nessuno studio ha individuato SAV1 in qualche difetto cardiaco. (22) Tuttavia, in base ai nostri dati, il potere discriminante è risultato molto alto.

Solo osservazioni sporadiche sono fatte in passato per *STK4* e *PRKACB*. La carenza di STK4 è coinvolta nella immunodeficienza primaria T, che si caratterizza per la progressiva perdita di cellule T naive, manifestazioni autoimmuni e malformazioni cardiache, tra cui i difetti del setto atriale. (23) Topi transgenici con sovra-espressione STK4 cardio-specifica hanno sviluppato una cardiomiopatia dilatativa secondaria ad upregulation dell'apoptosi dei miociti. (24) Per quanto riguarda PRKACB, mutazioni inattivanti o importanti delezioni sono stati associati con il complesso di Carney complesso, una sindrome rara, a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da lesioni pigmentate della cute e delle mucose, mixomi cardiaci e cutanei, iperattività endocrina e schwannomi.

ARF1 (ADP-Ribosylation Factor 1) codifica per una piccola GTPasi che interviene sull'attività ADP-ribosiltransferasica assumendo - in quanto attivatore della fosfolipasi D - un ruolo attivo nel traffico vescicolare. Studi recenti hanno dimostrato il coinvolgimento di ARF1 da una parte nello sviluppo embrionale nel topo (25), dall'altra nella regolazione della via Rho/MLC. (26)

Benché una qualsiasi correlazione tra ridotta espressione di ARF1 e sviluppo di CHD non sia ancora stata provata, il fatto che RhoA sia una proteina implicata - insieme a Rac1 - nella morfogenesi delle valvole cardiache (27) rende lecito ventilare tale ipotesi.

DPP-8 (Dipeptidyl Peptidase 8) appartiene invece a una famiglia di proteine piuttosto studiate i cui componenti hanno ruoli dimostrati (28), tra l'altro, nelle interazioni cellula-matrice nonché in molti processi di remodeling tissutale. In particolare, elementi con iperespressione di DDP-8 mostrano alterazioni a carico della migrazione cellulare e della riparazione delle ferite. Come DDP-9, DDP-8 possiede inoltre attività pro-apoptotica. Un suo eventuale ruolo nello sviluppo cardiaco e nella genesi di eventuali anomalie sembra quindi, almeno intuitivamente, possibile.

Tra le vie di signaling fondamentali - e ubiquitarie nelle cellule - sono certo da includere gli enzimi della famiglia delle **protein-kinasi C**, le cui isoforme mostrano marcato overlap funzionale. Con riferimento all'isoforma δ (PKCD), uno studio recente (29) ha messo in evidenza il suo ruolo nella regolazione della crescita delle strutture cardiache (sia in fase embrionale che nella risposta allo stress) attraverso complesse interazioni con i network di signaling. In effetti, topi con ablazione miocardio-specifica di PKCD/PKCDE mostrano cuori di normali dimensioni, ma con alterazioni trascrizionali tipiche dell'ipertrofia patologica, suggerendo un ruolo di tali enzimi nelle vie di inibizione a feedback che regolano i processi di crescita delle strutture cardiache.

Il gene **PSMF1** (Proteasome Inhibitor Subunit 1 - P131) ha già, in studi precedenti, mostrato una riduzione significativa dei valori di conte medie nei casi patologici; codifica per una proteina citoplasmatica che, bloccando l'attività del proteasoma 20S, inibisce l'idrolisi di proteine e substrati peptidici (30). Non è noto, in letteratura, alcun ruolo di PSMF1 nella patogenesi delle CHD; i risultati dello screening molecolare sembrano tuttavia promettenti in questo senso. SAP30, il suo analogo SAP30L e le restanti proteine della famiglia SAP (SIN3A-Associated Protein) costituiscono un complesso multi-subunità che interviene regolando, mediante deacetilazione degli istoni, l'attività di trascrizione. Un gruppo di ricerca finlandese (31) ha recentemente dimostrato che embrioni di Zebrafish con knockout di SAP30L sviluppano ipoplasia delle strutture cardiache. Coerentemente, un altro studio che indagava il ruolo di delezioni 5q33 nello sviluppo di CHD ha individuato, in corrispondenza della regione deleta, i loci di HAND1 e SAP30: entrambi i geni hanno ruolo già dimostrato nello sviluppo cardiaco, supportando l'ipotesi che l'aploinsufficienza di uno o di entrambi possa effettivamente contribuire allo sviluppo di CHD.

SH3GLP1 (SH3-domain GRB2-Like endophilin B1) codifica per la proteina endofilina B1: interagendo con Bax (famiglia Bcl-2), questa ha un ruolo già noto (32) nella regolazione negativa dell'apoptosi; è inoltre fondamentale nel mantenimento della morfologia della membrana

mitocondriale esterna. Un'alterazione a questo livello può evidentemente indurre una dysregulation del pathway pro-apoptotico, con conseguenti anomalie a carico dei processi di morfogenesi e rimodellamento.

Le conoscenze relative a *SND1* (Staphylococcal Nuclease and tudor Domain containing 1) (33) si focalizzano sul suo ruolo nell'oncogenesi: la proteina risulta in effetti iperespressa in vari tipi di carcinomi e nei gliomi di alto grado; gli studi molecolari in proposito hanno dimostrato un'attività complessa nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Non sono a ora note evidenze di un suo ruolo nella morfogenesi cardiaca.

I dati del presente studio supportano la nostra ipotesi iniziale, secondo la quale mRNA con espressione aberrante in caso di CHD possano essere rilevati sia a livello placentare sia nel plasma materno. (34) E' stato segnalato, infatti, che placente di gravidanze complicate da sindrome del cuore sinistro ipoplasico siano caratterizzate da un'anomalia morfologica del parenchima, suggerendo che un'immaturità della struttura possa essere la causa dell'anomalia vascolare. (35) Ad oggi, tuttavia, si sa poco per quanto riguarda la possibile correlazione tra l'espressione genica a livello placentare e lo sviluppo del cuore fetale, in particolare per quanto riguarda la base biologica capace di spiegare questa correlazione. Come riportato in precedenza (18), l'origine comune dal mesoderma (mesoderma intra-embriionale e extra-embriionale), potrebbe svolgere un ruolo in questo contesto.

La letteratura scientifica su questo specifico argomento specifico è ancora scarsa e, a oggi, solo pochi tentativi di creare uno screening valido per le CHD sono stati fatti. Anche se la dimensione del campione del presente studio è relativamente piccola e il gruppo di CHD eterogeneo, questi risultati rappresentano un passo in avanti per quanto riguarda uno screening precoce. Alcune questioni devono essere, tuttavia, ancora risolte prima che la prospettiva di un uso clinico sia realistica. In primo luogo, è possibile che solo alcuni tipi di CHD correlino con l'espressione degli mRNA placentari circolanti individuati. Infatti, in questa serie di dati, i risultati migliori sono stati ottenuti per la coartazione dell'aorta, la Tetralogia di Fallot, la trasposizione e completa dei grossi vasi e le anomalie del ritmo cardiaco. Al contrario, per altre forme di CHD, come i difetti settali, l'espressione degli mRNA non ha differito rispetto all'atteso. In secondo luogo, alcune considerazioni in merito alla tecnologia Nanostring meritano di essere fatte. In alcuni campioni, il conteggio dei geni housekeeping in caso di gravidanza erano inferiori al valore dei casi non gravidi. Le cause di questo risultato potrebbero essere la quantità di materiale di partenza disponibile (inferiore a 100 ng del totale), che non era sufficiente per rilevare l'RNA fetale, ma anche il degrado dei campioni iniziali. Una limitazione osservata durante l'elaborazione dei risultati è stata anche la mancanza di omogeneità tra i singoli gruppi. In futuro, sarà necessario reclutare un

maggior numero di campioni per ciascuna delle sei categorie dei CHD e il metodo di estrazione dovrà essere migliorato per ottenere e minimizzare la degradazione dell'RNA adatto per la tecnologia NanoString.

CONCLUSIONI

A tutt'oggi solo pochi tentativi di elaborare un valido metodo di screening per le CHD sono stati fatti. Questi dati rappresentano un passo in avanti verso uno screening molecolare delle CHD basato sull'individuazione di biomarkers in forma di mRNA placentari circolanti già in epoca gestazionale precoce e su larga scala.

BIBLIOGRAFIA

1. Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation* 1971;43:323-32.
2. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine (10th ed.). Saunders, 2014.
3. Van der Linde D, Konings EE, Slager MA. Birth prevalence of congenital heart diseases worldwide. A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 15;58(21):2241-7
4. Allen HD, Driscoll DJ, Shaddy RE et al. Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children and Adolescents: Including the Fetus and Young Adult (8th ed). Wolters Kluwer Health, 2012.
5. Branzi A, Picchio FM. Core Curriculum. *Cardiologia* (1a ed.). Mc Graw- Hill, 2013.
6. Nora JJ. Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction. *Circulation*. 1968 Sep;38(3):604-17.
7. Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica (SIEOG). Linee Guida di Ecografia Ostetrico Ginecologica. Editeam, 2015.
8. Callen PW. *Ecografia in Ostetricia e Ginecologia* (5a ed.). Elsevier Masson, 2009.
9. Murata Y, Takemura H, Kurachi K. Observation of fetal cardiac motion by M-mode ultrasonic cardiography. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 111:287-94.
10. Allan LD, Tynan M, Campbell S et al. Echocardiographic and anatomical correlates in the fetus. *Br Heart J* 1980; 44:444–451.
11. Bromley B, Estroff JA, Sanders SP et al. Fetal echocardiography: accuracy and limitations in a population at high and low risk for heart defects. *Am J Obstet Gynecol*. 1992; 166(5):1473-81.
12. Bull C. Current and potential impact of fetal diagnosis on prevalence and spectrum of serious congenital heart disease at term in the UK. British Paediatric Cardiac Association. *Lancet* 1999; 356:1242–1247.
13. Garne E, Stoll C, Clementi M. EUROSCAN Group. Evaluation of prenatal diagnosis of congenital heart diseases by ultrasound: Experience from 20 European registries. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17:386–91.
14. Kirk JS, Riggs TW, Comstock CH et al. Prenatal screening for cardiac anomalies: the value of routine addition of the aortic root to the fourchamber view. *Obstet Gynecol* 1994; 84(3):427-31.

15. Carvalho JS, Allan LD, Chaoui R et al. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic screening examination of the fetal heart. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(3):348-59.
16. Meyer-Wittkopf M, Cooper S, Sholler G et al. Correlation between fetal cardiac diagnosis by obstetric and pediatric cardiologist sonographers and comparison with postnatal findings. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 May; 17(5):392-7.
17. Clur SA, Ottenkamp J, Bilardo CM. The nuchal translucency and the fetal heart: a literature review. *Prenat Diagn*. 2009; 29(8):739-48.
18. Farina A, Volinia S, Arcelli D et al. Evidence of genetic underexpression in chorionic villi samples of euploid fetuses with increased nuchal translucency at 10-11 weeks' gestation. *Prenat Diagn*. 2006 Feb;26(2): 128-33.
19. Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C et al. Identification of circulating placental mRNA in maternal blood of pregnancies affected with fetal congenital heart diseases at the second trimester of pregnancy: implications for early molecular screening. *Prenat Diagn*. 2010 Mar;30(3):229-34.
20. NanoString Technologies. nSolver 2.5 Analysis Software Manual, 2014.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
22. Callus BA, VerhagenAM, VauxDL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiledcoil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J* 2006;273(18):4264–76 Epub 2006 Aug 23.
23. AbdollahpourH, AppaswamyG, KotlarzD, et al. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood* 2012;119(15):3450–7.
24. Yamamoto S, YangG, ZablockiD, et al. Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2003;111(10):1463–1474.
25. Hayakawa N, Ogoh H, Sumiyoshi M et al. The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct 31;453(4):748-53.
26. Schlienger S, Campbell S, Claing A. ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell*. 2014 Jan;25(1):17-29.
27. Gould RA, Yalcin HC, MacKay JL et al. Cyclic Mechanical Loading Is Essential for Rac1-Mediated Elongation and Remodeling of the Embryonic Mitral Valve. *Curr Biol*. 2016 Jan 11;26(1):27-37.
28. Yu DM, Wang XM, Ajami K et al. DP8 and DP9 have extra-enzymatic roles in cell

- adhesion, migration and apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2006;575:63-72.
29. Song M, Matkovich SJ, Zhang Y. Combined cardiomyocyte PKC δ and PKC ϵ gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal.* 2015 Apr 21;8(373).
 30. Li X, Thompson D, Kumar B et al. Molecular and cellular roles of PI31 (PSMF1) protein in regulation of proteasome function. *J Biol Chem.* 2014 Jun 20;289(25):17392-405.
 31. Teittinen KJ, Grönroos T, Parikka M et al. SAP30L (Sin3A-associated protein 30-like) is involved in regulation of cardiac development and hematopoiesis in zebrafish embryos. *J Cell Biochem.* 2012 Dec;113(12): 3843-52.
 32. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008 Jun 15;22(12):1577-90.
 33. Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J et al. Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *Int J Oncol.* 2015 Feb;46(2):465-73.
 34. NgEK, TsuiNB, LauTK, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 (8):4748–53 Epub 2003 Mar 18.
 35. JonesHN, OlbrychSK, SmithKL, et al. Hypoplastic left heart syndrome is associated with structural and vascular placental abnormalities and leptin dysregulation. *Placenta* 2015pii: S0143-4004(15)30030-8.