

Biomarker di maturità cerebrale feto-neonatale

D. Gazzolo

Dipartimento Materno Infantile, S.O.C. di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale,
Ospedale Pediatrico "Cesare Arrigo", Alessandria

Riassunto

La diagnosi, la cura e la prevenzione delle patologie dello sviluppo del sistema nervoso centrale (CNS), rappresentano una delle principali strategie operative per ridurre una delle maggiori cause di mortalità prenatale e di mortalità/morbilità perinatale.

Numerosi studi sono stati condotti al fine di accertare i tempi e le modalità eziopatogenetiche dei disturbi dello sviluppo del CNS specialmente nei casi in cui non vi fosse una causa genetica. Attualmente l'obiettivo principale rimane sempre la diagnosi precoce e l'individuazione in fasi estremamente precoci dei casi ad alto rischio. Nel caso specifico delle patologie del CNS, l'obiettivo primario risiede nella possibilità di utilizzare marcatori specifici coinvolti nelle fasi di accrescimento del tessuto nervoso ed allo stesso tempo capaci di segnalare alterazioni dello sviluppo stesso. S100B è una proteina calcio legante della famiglia *EF hand* che è localizzata principalmente nel tessuto nervoso a livello delle cellule gliali, delle cellule di Schwann ed astrociti. Popolazioni neuronali specifiche esprimono S100B. L'emivita della proteina è di circa un'ora e viene eliminata principalmente dall'emuntorio renale. Numerose

funzioni sono state attribuite alla proteina, tra le quali i processi di comunicazione cellulo-cellulare, i processi di crescita cellulare, trasduzione e trasmissione dei segnali cellulari.

Studi condotti su modelli animali da esperimento, su colture cellulari umane e mediante determinazione delle concentrazioni della proteina nei liquidi biologici hanno rilevato come S100B a concentrazioni fisiologiche si comporti come una citochina esercitando un ruolo neurotrofico.

Tiu et al. hanno recentemente confermato le pregresse osservazioni di Zuckerman et al. di un diretto coinvolgimento della proteina nei processi embriogenici del CNS. Il ruolo neurotrofico è stato ampiamente descritto in studi recenti basati sugli effetti teratogenici (alcol, cocaina) in gravidanza. Recenti osservazioni rilevano che l'utilizzazione della proteina S100B, in medicina preperinatale, sembra soddisfare i criteri richiesti per un marcatore di normale o alterata funzione cerebrale: a) buona riproducibilità e semplicità di esecuzione; b) misurabilità in diversi liquidi biologici; c) possibile utilizzazione per il monitoraggio longitudinale; d) consolidata proprietà di marcatore quantitativo di maturazione e danno cerebrale.

Summary

Marker of fetal brain maturation and perinatal damage

Epidemiological reports showed that major neurological abnormalities present during childhood are already present in the first weeks after birth. This highlights the importance of antenatal and perinatal risk factors in subsequent development. Knowledge on the timing is still incomplete and subject to debate. At present, the diagnosis of perinatal insults has to rely on adequate

documentation of general-medical and obstetric factors, on radiological and laboratory assessments (determination of blood pH, the measurement of uric acid and lactate and the appearance of nucleated erythrocytes in the blood). Of note, the measurement of brain constituents may offer both an indicator of cell damage and of cell growth in the nervous system (CNS).

Such markers are also natural candidates to become early pathological indicators of CNS dysfunction at a

time when clinical and radiological assessments are still silent also providing a quantitative indicator of the extent of brain lesions.

The S100B protein, a calcium-binding protein highly concentrated in the nervous system, appears to satisfy the criteria required of such a marker in perinatal medicine: a) good reproducibility and simple execution/performance of measurements; b) detection in a wide

range of biological fluids, including cerebrospinal fluid, blood, amniotic fluid and urine, offering the possibility of reducing perinatal stress; c) possible employment in longitudinal monitoring owing to its half-life; d) well-established use as an early and quantitative marker of brain maturation and damage.

Key-words: S100B protein, prematurity, amniotic fluid, blood, IUGR.

Introduzione

La diagnosi, la cura e la prevenzione delle patologie dello sviluppo del sistema nervoso centrale (CNS), rappresentano una delle principali strategie operative al fine di ridurre una delle maggiori cause di mortalità prenatale e di mortalità/morbilità perinatale¹⁻⁴. Numerosi studi sono stati condotti al fine di accertare i tempi e le modalità eziopatogenetiche dei disturbi dello sviluppo del CNS specialmente nei casi in cui non vi fosse una causa genetica. Attualmente l'obiettivo principale rimane sempre la diagnosi precoce e l'individuazione in fasi estremamente precoci dei casi ad alto rischio. Nel caso specifico delle patologie del CNS, l'obiettivo primario risiede nella possibilità di utilizzare marcatori specifici coinvolti nelle fasi di accrescimento del tessuto nervoso ed allo stesso tempo capaci di segnalare alterazioni dello sviluppo stesso.

Nell'ambito di questa mini-review verranno riportati i dati principali di studi inerenti le concentrazioni della proteina S100B nei diversi liquidi biologici in epoca perinatale.

S100B e liquido amniotico

S100B è una proteina calcio legante della famiglia *EF hand* che è localizzata principalmente nel tessuto nervoso a livello delle cellule gliali, delle cellule di Schwann ed astrociti⁵. Popolazioni neuronali specifiche esprimono S100B. L'emivita della proteina è di circa un'ora e viene eliminata principalmente dall'emuntorio renale⁶. Numerose funzioni sono state attribuite alla proteina, tra le quali i processi di comunicazione cellulo-cellulare, i processi di crescita cellulare, trasduzione e trasmissione dei segnali cellulari⁵.

Studi condotti su modelli animali da esperimento, su colture cellulari umane e mediante determinazione delle concentrazioni della proteina nei liquidi biologici hanno rilevato come S100B a concentrazioni fisiologiche si comporti come una citochina esercitando un ruolo neurotrofico⁷.

I primi rilievi sperimentali e su umano, inerenti la presenza di S100B nel liquido amniotico con attività neurotrofica, si riferiscono alla fine degli anni '80 dove nelle gravidanze complicate da dipendenza materna all'alcool ed alla cocaina e nelle malformazioni del CNS si rilevavano alterate concentrazioni di S100B⁸⁻¹⁰.

Tiu et al. hanno recentemente confermato le pregresse osservazioni di Zuckerman et al. di un diretto coinvolgimento della proteina nei processi embriogenici del CNS^{11,12}. Il ruolo neurotrofico è stato ampiamente descritto in studi recenti basati sugli effetti teratogenici (alcol, cocaina) in gravidanza^{8,9}.

Nel periodo a cavallo tra gli anni '90 ed il nuovo millennio grazie al perfezionamento della misurazione della proteina S100B nel liquido amniotico è stata creata una curva di riferimento della proteina nel primo trimestre di gravidanza che ha consentito di correlare l'attività neurotrofica di S100B con i principali parametri ecografici indicatori di normale accrescimento del CNS quali: diametro bi-parietale, circonferenza cranica¹³. Di particolare interesse è stato lo studio condotto sulle gravidanze gemellari mono/di amniotiche dove sono state rilevate diverse concentrazioni di S100B (maggiori nelle monoamniotiche)¹⁴. Nell'ambito degli studi atti ad individuare i casi ad alto rischio di mortalità intrauterina nel III trimestre di gravidanza è stato condotto uno studio su 854 gravidanze di cui 11 erano state complicate dalla classica *unexplained perinatal death*. I campioni di liquido amniotico erano stati raccolti nel I trimestre di gravidanza al momento dell'amniocentesi per motivi genetici ed al contempo erano state misurate le concentrazioni dell'alfa-fetoproteina e di S100B. I risultati hanno evidenziato che le concentrazioni di S100B nel liquido amniotico erano significativamente elevate nei casi con danno cerebrale e/o morte intrauterina rispetto ai controlli, mentre nessuna differenza nelle concentrazioni di alfa-fetoproteina sono state rilevate¹⁵. I dati supportano l'ipotesi del coinvolgimento della proteina nei meccanismi di necrosi neuronale e di apoptosi. Inoltre la possibilità di individuare precocemente i casi a rischio di sequele neurologiche rende il test di rapido utilizzo nella pratica clinica corrente. Infatti, l'analisi statistica effettuata ha rilevato che S100B come test diagnostico di morte intrauterina con un cut-off di (4,431 MoM: 95% CI 3,605-6,197) aveva una sensibilità, specificità, PPV, NPV del 100%.

S100B ed il sangue materno

La possibilità che il sangue materno possa fornire utili indicazioni sullo stato di accrescimento e di danno del CNS nel periodo perinatale appare di particolare

interesse. L'ipotesi nasce dal fatto che in seguito agli importanti processi di accrescimento tipici della gravidanza, ed in particolare nel III trimestre, e/o in seguito a *noxae* patogene a carico del CNS fetale è ragionevole supporre che esista un gradiente di diversità di S100B tra il distretto fetale e quello materno. Inoltre, in considerazione del basso peso molecolare della proteina (21kD) è possibile che nelle condizioni precedentemente descritte, in assenza di patologie a carico del CNS materne, attraverso un meccanismo di trasporto passivo, una parte di S100B fetale venga rilasciata nel distretto materno consentendo così la diagnosi di sofferenza perinatale¹⁶.

Lo studio delle variazioni di S100B nel sangue materno di feti fisiologici o complicati da ipossia in utero è in stato condotto su 318 gravidanze in cui la proteina S100B è stata misurata in prossimità del parto. La popolazione di studio era così costituita: 212 gravidanze fisiologiche, 106 complicate da ritardato accrescimento intrauterino (IUGR). I neonati delle gravidanze IUGR sono stati in seguito classificati in: *small for gestational age* (n=46), IUGR con redistribuzione del flusso fetale senza emorragia cerebrale (IVH) (n=34), IUGR con redistribuzione del flusso fetale e IVH (n=26). I risultati ottenuti hanno evidenziato che le concentrazioni di S100B nel distretto materno aumentavano in condizioni di ipossia fetale ed in particolare nei casi complicati da IVH nella prima settimana di vita. L'analisi statistica ha rilevato che S100B come test diagnostico per la predittività di IVH aveva, con un cut-off di 0,72 µg/L, la sensibilità del 100% (95% CI: 87-100%) e la specificità 99,3 % (95% CI: 97,5-99,9%).

Conclusioni

I dati in letteratura consolidano la nozione che in medicina perinatale la valutazione dello stato di maturazione cerebrale sta diventando possibile. Tuttavia, il raggiungimento di un livello affidabile a garantire una corretta gestione delle diverse fasi della gravidanza, ed in particolare modo del cosiddetto *black-hole* del perinatologo costituito dal *timing* del parto, rimangono ancora un obiettivo da conseguire. Il monitoraggio perinatale ha un aspetto tipico di Giano bifronte: se da un lato grazie all'aggiornamento tecnologico, costituito dall'ecografia di I e II livello, dalla velocimetria Doppler fetto-placentare e materna, abbiamo la capacità di ottenere informazioni più dettagliate sullo stato di benessere fetale, dall'altro lato, i dati epidemiologici ci confermano che il trend di incidenza delle patologie maggiori invalidanti è sostanzialmente piatto. Risulta pertanto auspicabile introdurre nella pratica corrente una diversa strategia operativa che preveda l'integrazione dei dati ottenuti dalla procedura standard di monitoraggio con quelli di monitoraggio biochimico. S100B può costituire associata o no ad altri biomarkers un parametro utile per individuare nel periodo perinatale i casi di iposviluppo o IUGR che costituiscono ormai il 10-15% dei neonati a rischio. La maggiore

affidabilità di S100B rispetto ad altri marcatori, altrettanto o maggiormente specifici, per il monitoraggio del CNS risiede nel fatto che la sua metodica di dosaggio è stata standardizzata con la creazione di curve di riferimento a seconda delle diverse procedure di misurazione (ELISA; chemiluminescenza etc.), dei diversi liquidi biologici (CSF, sangue, liquido amniotico, urine, saliva) e delle diverse fasce di età (feto, neonato, bambino, adulto). In particolare, il periodo perinatale, in considerazione del tipo di paziente (feto, neonato, gravida), rappresenta una disciplina di nicchia con specifiche completamente differenti dal mondo dell'adulto. Basti pensare che il monitoraggio dei neonati, di peso inferiore a 1500 g con un volume ematico totale di circa 50 cc, non potrebbe essere effettuato con i prelievi da 2,5 mL di campione, previsti per l'adulto, e a frequenza di 4 ore per una corretta valutazione del CNS e delle terapie praticate nell'area intensiva. La diretta conseguenza di ciò risiede nella ricerca di volumi di campionamento sempre più bassi ed in liquidi biologici non-invasivi quali l'urina e la saliva.

L'evoluzione estrema di questa ricerca ci ha portato a considerare, in gravidanza, il distretto materno non più come il tradizionale sistema di monitoraggio di eventuali patologie della gravida, ma un potenziale bacino di informazioni sullo stato di benessere fetale ottimale in termini di invasività, stress e ripetibilità dei controlli.

In conclusione, l'utilizzazione della proteina S100B, in medicina pre-perinatale, sembra soddisfare i criteri richiesti per un marcatore di normale o alterata funzione cerebrale: a) buona riproducibilità e semplicità di esecuzione; b) misurabilità in diversi liquidi biologici; c) possibile utilizzazione per il monitoraggio longitudinale; d) consolidata proprietà di marcatore quantitativo di maturazione e danno cerebrale.

Bibliografia

1. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum asphyxia and cerebral palsy. *Pediatrics* 1988; 82:240-9.
2. Hughes I, Newton R. Genetic aspects of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 1992; 34:80-6.
3. Hagberg B, Hagberg G, Olow I, van Wendt L. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VII. Prevalence and origin in the birth year period 1987-1990. *Acta Paediatr* 1996; 85:954-60.
4. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrandt P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-1994. *Acta Paediatr* 2001; 90:271-7.
5. Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: a tool in perinatal medicine. *Clin Chem* 2002; 48:2097-104.
6. Jonsson H, Johnsson P, Hoglund P, Alling C, Blomquist S. Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000; 14:698-701.
7. Yang Q, Hamberger A, Hyden H, Wang S, Stigbrand T, Haglid KG. S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. *Brain Res* 1995; 696:49-4.

8. Akbari HM, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Prenatal cocaine decreases the trophic factor S-100 beta and induced microcephaly: reversal by postnatal 5-HT1A receptor agonist. *Neurosci Lett* 1994; 170:141-4.
9. Zhou FC, Sari Y, Zhang JK, Goodlett CR, Li T. Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. *Brain Res Dev Brain Res* 2001; 126:147-55.
10. Sindic CJ, Freund M, Van Regemorter N, Verellen-Dumoulin C, Masson PL. S-100 protein in amniotic fluid of anencephalic fetuses. *Prenat Diagn* 1984; 4:297-302.
11. Zuckerman JE, Herschman HR, Levine L. Appearance of a brain specific antigen (the S-100 protein) during human foetal development. *J Neurochem* 1970; 17:247-51.
12. Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, Shafer BW, Shu SY, Yew DT. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 7:159-68.
13. Gazzolo D, Bruschetti M, Corvino V, Lituania M, Sarli R, Bruschetti PL, et al. S100B protein concentrations in amniotic fluid are correlated with gestational age and with cerebral ultrasound scanning parameters results in healthy fetuses. *Clin Chem* 2001; 47:954-6.
14. Gazzolo D, Lituania M, Bruschetti M, Bruschetti P, Michetti F. S100B protein concentrations in amniotic fluid are higher in monoamniotic than in diamniotic twins and singleton pregnancies. *Clin Chem* 2003; 49:997-9.
15. Florio P, Michetti F, Bruschetti M, Lituania M, Bruschetti P, Severi FM, et al. Amniotic fluid S100B protein in mid-gestation and intrauterine fetal death. *Lancet* 2004; 364:270-2.
16. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Lituania M, Marras M, Bruschetti M et al. High Maternal Blood S100B Concentrations in Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction and Intraventricular Hemorrhage. *Clin Chem* 2006; 52:819-6.