Nuovi sviluppi della diagnosi prenatale: implicazioni cliniche, limiti attuali, prospettive future

Alessandra Graziottin
Direttore, Centro di Ginecologia e Sessuologia Medica
H. San Raffaele Resnati, Milano
Presidente, Fondazione Alessandra Graziottin per la cura del dolore nella donna Onlus
www.alessandragraziottin.it
www.fondazionegraziottin.org

Introduzione

La maggior parte dei bambini **nati con sindrome di Down è figlia di madre con età inferiore ai 35 anni**. Questo perché le donne di età superiore fanno con più probabilità la diagnosi prenatale invasiva (villocentesi o amniocentesi).

Dal punto di vista più generale, in Italia nascono ogni anno circa 540.000 bambini di cui circa 3150 affetti da alterazioni cromosomiche (AAVV, Agenzia servizi sanitari 2013). Le **alterazioni cromosomiche** (o **aneuploidie**) si presentano nella maggior parte dei casi come alterazioni numeriche dei cromosomi.

Le aneuploidie più comuni sono la Sindrome di Down (Trisomia 21), la Sindrome di Edwards (Trisomia 18) e la Sindrome di Patau (Trisomia 13), caratterizzate dalla presenza di un cromosoma aggiuntivo (**trisomia**) rispetto alla normale coppia. Riguardano sia i cromosomi autosomici (ossia le prime 22 coppie), sia i cromosomi sessuali X e Y (ossia la coppia 23).

Le **aneuploidie dei cromosomi sessuali** sono caratterizzate **o dalla perdita di un cromosoma sessuale** (X o sindrome di Turner, 45 X0) o **dalla presenza di un cromosoma sessuale in più** rispetto alla normale coppia (XXX, XYY, XXY o sindrome di Klinefelter, 47 XXY).

Esistono altre forme di alterazioni in cui il numero di cromosomi si mantiene "normale" ma si verifica una perdita (**microdelezione**) di un tratto di un cromosoma e, di conseguenza, dei geni localizzati su quel frammento cromosomico. Possono interessare diversi cromosomi e possono essere causa di sindromi di importanza clinica variabile a seconda del cromosoma coinvolto, della regione cromosomica interessata e delle relative dimensioni.

Le principali sindromi a microdelezione investigate comprendono la Sindrome di DiGeorge (delezione 22q11.2) , la Sindrome Cri-du-chat (delezione 5p), la Sindrome di Prader-Willi (delezione 15q11.2), la Sindrome di Angelman (delezione 15q11.2), la Sindrome da delezione 1p36, la Sindrome di Wolf-Hirschhorn (delezione 4p).

Indagini prenatali: di screening e diagnostiche

Le indagini prenatali che consentono di individuare nel feto eventuali alterazioni cromosomiche possono essere eseguite attraverso:

1. **procedure non invasive**, come gli esami ultrasonografici e le valutazioni dei marcatori biochimici dosabili nel siero materno (**screening prenatale**);

2. **tecniche diagnostiche invasive**, come villocentesi e amniocentesi (**diagnosi prenatale**).

La **diagnosi prenatale**, necessaria per la definizione della costituzione genetica del feto, viene suggerita in tutti i casi in cui vi sia **un'indicazione di rischio per una patologia genetica grave**.

I fattori che determinano l**a necessità dell'intervento diagnostico** sono di diversi tipi:

1. **fattori genetici**, quali familiarità per patologie genetiche o genitori portatori sani di mutazioni patologiche;
2. **fattori epidemiologici**, o di rischio acquisito, come **l'età materna avanzata**, significativamente associata all'insorgenza di anomalie cromosomiche fetali;
3. **positività ai test di screening prenatali** non invasivi.

Entrambe le tecniche di diagnosi prenatale, **villocentesi e amniocentesi**, comportano **un rischio di perdita fetale** legato all'invasività di questa procedura diagnostica, attestato intorno **allo 0.5-1%**. A questo sono da sommare **la percentuale di rischio di aborto spontaneo** che, alla 16a settimana di gestazione, è stimato intorno allo 0,7%, e altre complicanze transitorie che possono subentrare durante l'esame. E' inoltre importante sottolineare che a questi esami si aggiunge spesso uno stato d'ansia dovuto all'iter di ospedalizzazione a cui la donna in gravidanza deve sottoporsi.

Questi limiti spiegano come la meta auspicata da coloro che operano in ambito diagnostico prenatale **sia la possibilità di effettuare una diagnosi senza ricorrere a tecniche invasive, eliminando quindi i rischi a carico del feto**.

Inoltre un **test non invasivo** permetterebbe un'**estensione dell'analisi del materiale genetico fetale** a donne per le quali non è indicata la diagnosi prenatale invasiva, **a donne giovani**, a donne che vogliono semplicemente conoscere lo stato genetico del proprio bambino. Per tale motivo negli ultimi 20 anni è cresciuto l'interesse per la messa a punto di procedure diagnostiche non rischiose per il feto, finalizzate alla ricerca di una fonte alternativa di materiale genetico fetale e all'anticipazione dell'epoca del prelievo (Lo et al 1997; Lo et al 2010; Lam et al 2012)

Diagnosi sul DNA fetale libero nel sangue materno

La placenta NON costituisce una barriera che mantiene separati la madre e il feto geneticamente differenti. Si trova piuttosto al centro di un traffico bidirezionale di materiale cellulare e genetico, che ha portato quindi alla nascita di un nuovo campo di ricerca.

Tale ricerca si basa sul **recupero di materiale genetico fetale dal sangue materno**, sia sotto forma di **cellule fetali** sia sotto forma di **acidi nucleici fetali** (Lo et al 1997; Lo et al 2010; Lam et al 2012).

La via che attualmente viene considerata più promettente per lo sviluppo di protocolli di diagnosi prenatale non invasiva è quella che prevede **l'utilizzo del DNA fetale libero (cell free fetal DNA - cffDNA) come fonte di materiale genetico** attraverso cui condurre le **analisi del genotipo fetale**.

Questo tipo di ricerca ha avuto una forte spinta grazie ai primi studi

di Lo e collaboratori che, nel 1997, riuscirono ad amplificare specifiche sequenze del cromosoma Y, dimostrando per la prima volta che il cffDNA è presente nel plasma di donne in attesa di un feto di sesso maschile. Successivamente lo stesso autore (Lo et al 2010) ha dimostrato che **il sequenziamento del cffDNA presente nel plasma di donne in gravidanza è una rappresentazione esatta dell'intero DNA del feto**, aprendo definitivamente la strada verso la realizzazione di metodi di analisi prenatale basati sull'analisi e il sequenziamento del cffDNA (Lo et al 1997; Lo et al 2010; Lam et al 2012).

Il **DNA libero nel circolo materno** si presenta come una **miscela di frammenti di acidi nucleici** aventi **due distinte origini: la madre e il feto**. Verificare la concentrazione del DNA fetale rispetto a quello materno è stato uno dei primi aspetti del cffDNA ad essere approfondito. Ancora oggi, la valutazione della quota fetale contenuta nei campioni di DNA libero rimane un dato di fondamentale importanza per ogni studio intrapreso, dal momento che dalla percentuale di quota fetale dipende l'effettiva possibilità di poter condurre delle analisi sul cffDNA (DNA circolante libero). **La quantità di cffDNA si attesta mediamente intorno al 10% durante il primo trimestre per poi crescere fino al 20-25% al terzo trimestre**.

Una **peculiarità del DNA fetale, di fondamentale importanza per la diagnostica prenatale, è la sua rapida rimozione dal circolo materno dopo il parto**: una sua persistenza non permetterebbe infatti analisi in gravidanze successive alla prima. Distinguere o addirittura isolare il DNA libero di origine fetale in un elevatissimo background materno rappresenta la sfida tecnica di questo ultimo decennio.

La tecnica base più comunemente utilizzata per rilevare e identificare specifiche sequenze di cffDNA è la **reazione a catena della polimerasi (PCR)**. Numerosi tipi diversi di PCR sono stati testati, e fra questi la Digital PCR ha ottenuto i migliori risultati, proponendosi come la metodica più affidabile per la quantificazione del DNA fetale.

Durante la reazione di PCR **i pochi frammenti di DNA vengono copiati e amplificati più volte**, per ottenerne una quantità sufficiente per il successivo sequenziamento necessario alla "lettura" delle informazioni cromosomiche.

Molto recentemente sono stati sviluppati nuovi sistemi automatizzati di sequenziamento, basati sulla tecnica di "**Next-Generation Sequencing**" (NGS), i quali sembrano aver ampliato enormemente le possibilità di diagnosi prenatale non invasiva poiché dimostrano **livelli di precisione e sensibilità molto superiori ai metodi tradizionali**, consentendo la quantificazione di ogni singola molecola di acido nucleico.

Questo tipo di **approccio diagnostico è molto promettente sia nella diagnosi di aneuploidia sia nella diagnosi di malattie monogeniche** (Lam et al 2012; Nepomnyashchaya et al 2013). In tempi brevissimi, diverse piattaforme tecnologiche basate su questo nuovo sistema di sequenziamento sono state sviluppate e via via perfezionate, dando origine a **una vera e propria rivoluzione nel campo del sequenziamento degli acidi nucleici**, sia per quanto riguarda la quantità dei dati prodotti sia per la velocità con cui essi vengono generati.

Inoltre, negli ultimi anni si è assistito a una considerevole **diminuzio-**

ne dei costi di processamento dei campioni, fattore essenziale che ha favorito l'ampia diffusione di questi sistemi. Negli ultimi anni, diversi gruppi di ricerca si sono dedicati allo sviluppo di protocolli per la diagnosi delle aneuploidie attraverso diverse tecniche, compreso il NGS, con particolare riferimento per le aneuploidie dei cromosomi 21, 18, 13 e sessuali (Bianchi et al 2014; Palomaki et al 2012; Xiaolin et al 2015; Rava et al 2014; Sehnert et al 2011). I risultati emersi dai diversi trial hanno mostrato un'elevata efficacia della tecnologia nella definizione di queste cromosomopatie, in particolare nella determinazione della Trisomia 21 (T21).

A oggi i valori di **sensibilità**, pur variando leggermente a secondo del test adottato, si attestano al **99% per la Trisomia 21, al 97.5% per la Trisomia 18 e all'83,3% per la Trisomia 13**. I dati ottenuti per le aneuploidie dei cromosomi sessuali sono meno consistenti (aneuploidie X 60-100%). Ma si attestano al **95% per rilevare la Monosomia X**, con percentuali di falsi positivi <0.1%.

Recenti pubblicazioni hanno messo in evidenza come le **indagini sul cffDNA** basate su tecniche NGS si siano rivelate **utili**, non solo per le anomalie che coinvolgono interi cromosomi, ma anche per **la diagnosi di traslocazioni, microdelezioni e microduplicazioni**, con una definizione spesso maggiore rispetto alle tecniche tradizionali. A dimostrazione di questo può essere citato il recente studio pubblicato da Srinivasan nel 2013, in cui si descrive l'identificazione di una microdelezione a carico del feto dell'ordine dei 300Kb (Srinivasan et al 2013).

Limiti della ricerca del DNA fetale nel sangue materno

Diverse aziende al mondo offrono oggi servizi di screening prenatale per le aneuploidie cromosomiche. Tuttavia, l'introduzione nella pratica clinica di routine di questi test non invasivi è ancora difficoltosa. Tra i fattori limitanti troviamo **i tempi di esecuzione dei protocolli** delle tecniche NGS, più lunghi rispetto a quelli tradizionali, e i costi, sia degli strumenti che dei reagenti, che per essere abbattuti efficacemente richiedono elevati numeri di campioni da analizzare. Un'ulteriore difficoltà che si riscontra nelle **indagini sul DNA libero**, a causa della **ridotta quantità del DNA fetale**, è data dalla necessità di avere a disposizione **una cospicua quantità di plasma** da processare e **una sufficiente frazione fetale** in esso contenuta, condizioni non sempre possibili.

A conferma di ciò, si riscontra in molti lavori **l'esclusione dalle analisi di diversi campioni** a causa dell'**esigua quantità di plasma** o della **scarsa concentrazione del cffDNA** in essi presente. Questo dato mette in evidenza un ulteriore fattore limitante di cui bisogna tenere conto nelle analisi del cffDNA, ovvero la presenza del **rischio di fallimento, stimato attualmente intorno al 4-5%**.

A questi limiti bisogna aggiungere una criticità prettamente italiana, dovuta al fatto che non tutti i laboratori in Italia riescono ad effettuare le analisi nel proprio centro e sono costretti a spedire i campioni in service nei diversi centri in USA o in Cina dove vengono analizzati. Questo può comportare **un deterioramento del cffDNA** contenuto nel sangue materno

con conseguente perdita delle informazioni in esso contenute. Inoltre i **tempi di risposta** si allungano ulteriormente, superando spesso i 15 giorni. Per lo stesso motivo i **costi**, per ogni analisi, superano, spesso di molto, gli 800 euro.

Poiché i dati emersi dagli studi di validazione svolti finora dalle società che si occupano di sviluppare questi sistemi, oltre ai più recenti dati presentati in letteratura, fanno intuire come **il test non invasivo** (Non-Invasive Prenatal Test, NIPT) **basato sulla tecnologia NGS** possa offrire ai pazienti grandi opportunità di screening ma anche, in un vicino futuro, di diagnosi, sta emergendo anche in Italia la necessità di partecipare direttamente al continuo miglioramento e sviluppo dei già efficaci protocolli d'indagine. Alcuni centri pubblici, e un solo centro privato, si sono quindi proposti di raggiungere elevati standard di accuratezza, sensibilità e specificità per l'analisi delle diverse aneuploidie mediante le tecnologie NGS, offrendo nello stesso centro la diagnosi prenatale.

Per superare alcuni limiti del NIPT è stato introdotto per la prima volta in Italia un test che permette di mantenere gli elevati livelli di specificità e sensibilità grazie all'applicazione degli stessi protocolli, strumentazioni e materiali utilizzati dalla casa madre. L'esame ha dimostrato, in studi di validazione pre-clinica, un'attendibilità superiore al 99% nel rilevare la Trisomia 21, la Trisomia 18 e la Trisomia 13, e del 95% per rilevare la Monosomia X, con percentuali di falsi positivi <0.1%.

Inoltre il test permette **l'analisi dell'intero genoma** mediante Sequenziamento Massivo Parallello (MPS) e un sequenziamento a elevata risoluzione (profondità di lettura ~30 milioni di sequenze) con la possibilità di individuare anche la presenza di **alterazioni cromosomiche strutturali** e alcune **comuni sindromi da microdelezione/microduplicazione**. Al contrario, altri test attualmente in commercio valutano i dati reali derivanti dall'analisi senza associarli a valutazioni di rischio a priori (per esempio, l'età della paziente) ed effettuano un numero inferiori di ripetizioni dell'analisi (<1%).

Nonostante i grandi vantaggi che le analisi NIPT con cffDNA sono in grado di offrire, è importante ribadire che **il nuovo test**, qualunque sia il brand, **non sostituisce l'amniocentesi e la villocentesi, per due motivi**.

Primo, **amnio e villocentesi** sono esami **diagnostici**: a oggi sono gli unici esami che, attraverso la **raccolta di cellule fetali, permettono diagnosi certe al 100%**. Sono tuttavia invasivi, come già ricordato, con una variabile percentuale di rischio per il feto.

Secondo, queste tecniche permettono di osservare direttamente eventuali **difetti in tutto il corredo cromosomico** (formato da 23 coppie), non solo di tre cromosomi, e di **diagnosticare malattie che il test del Dna libero fetale non rileva**, come la fibrosi cistica, la talassemia, la distrofia muscolare di Duchenne/Becker, l'atrofia muscolare spinale, il ritardo mentale (sindrome X fragile), la sordità congenita. Bisogna anche sapere, però, che queste analisi non vengono eseguite di routine, ma bisogna richiedere la villocentesi o l'amniocentesi "con lo studio del DNA", più costoso di quelle "base". Infatti, dal momento che le malattie genetiche sono migliaia, queste indagini specifiche sono effettuate solo quando vi sia un rischio familiare per una o più malattie genetiche.

Di converso, **la ricerca del DNA libero fetale è ancora un test di screening** che identifica l'eventuale rischio di una particolare condizione, per esempio la Trisomia 21, ma non conferma nulla con certezza. Il vantaggio è che i semplici test di screening sono privi di rischi per il feto (anche se lo stress materno può essere elevato in caso di risultati dubbi o non utili).

Conclusioni

La ricerca di metodiche di diagnosi prenatale non invasive è in rapida crescita. Gli studi basati sull'analisi del DNA fetale hanno subito un notevolissimo incremento con la disponibilità delle tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS). Questi studi suggeriscono che ben presto, grazie agli strumenti e protocolli d'analisi ad altissima processività della NGS, si potrà raggiungere **un sempre maggiore potere d'analisi capace di avvicinarsi sempre di più ai poteri diagnostici delle tecniche prenatali invasive**.

In relazione alle aneuploidie, le tecnologie NGS hanno mostrato efficienza e affidabilità tali che in alcuni Paesi europei e negli Stati Uniti i protocolli d'analisi sono già inseriti nelle pratiche cliniche di screening per le Trisomie 21, 18 e 13. Oggi anche l'Italia, grazie all'introduzione di questi test in alcuni laboratori, può offrire questi **test di diagnosi prenatale** non invasiva e potrà così diventare, in un vicino futuro, un Paese leader nello sviluppo di nuove tecnologie in molteplici settori della genetica molecolare.

Aspetto fondamentale, la possibilità di diagnosi non invasive consentirà di allargare la diagnosi prenatale anche **a donne di età inferiore ai 35-40 anni**, così da riconoscere precocemente anomalie cromosomiche e genetiche che altrimenti possono costituire poi una sorpresa amarissima al momento della nascita.

Bibliografia essenziale

- AAVV Diagnosi prenatale ed ecografica in gravidanza- linee guida 2013. Agenzia servizi sanitari. Agenzia nazionale per i servizi sanitari regionali, 2013.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, Craig JA, Chudova DI, Devers PL, Jones KW, Oliver K, Rava RP, Sehnert AJ; CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening N Engl J Med. 2014 Feb 27;370:799-808
- Lam, KWG, Chiu, RWK and Lo, YMD. Noninvasive Prenatal Diagnosis of monogenic diseases by target massively parallel sequencing of maternal plasma: application to Beta-thalassemia. Clinical Chemistry - Molecular diagnostic end genetics, 2012: 58:1467-75
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet, 1997.
- Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med. 2010;2:61ra91
- Nepomnyashchaya, YN and Zhavoronkov, A. Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation sequencing technologies, and clinical considerations. Clin Chem Lab Med. 2013;51:1141-54.
- Palomaki GE1, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. Genet Med. 2012;14:296-305.
- Rava PP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. Clin Chem. 2014;60:243–250.

- Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. Clin Chem. 2011;57:1042–1049
- Srinivasan A1, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma.Am. J. Human Gen., 2013; Am J Hum Genet. 2013;92:167-76.
- Xiaolin Shi, Zhitao Zhang, David S. Cram, Caixia Liu. Feasibility of noninvasive prenatal testing for common fetal aneuploidies in an early gestational window. Clinica Chimica Acta 2015; 439, 24-28

Alessandra Graziottin
(a cura di)

ATTI E APPROFONDIMENTI
DI FARMACOLOGIA

MENOPAUSA PRECOCE:
dal dolore alla salute

MILANO - 27 MARZO 2015

CORSO ECM

Fondazione Alessandra Graziottin
per la cura del dolore nella donna Onlus
www.fondazionegraziottin.org

PROGRAMMA

08.00 - 08.45	Registrazione dei partecipanti
08.45 - 09.00	**Introduzione e obiettivi del corso** *Alessandra Graziottin (Milano)* *Anna Maria Paoletti (Cagliari)*
09.00 - 09.30	**Lettura inaugurale** **La menopausa precoce nell'adolescente** *Vincenzina Bruni (Firenze)*
09.30 - 11.00	**SIMPOSIO:** **MENOPAUSA PRECOCE, ORMONI SESSUALI E NEUROBIOLOGIA** *Moderatori: Giovanni Biggio, Vincenzina Bruni, Mario Meroni*
09.30 - 09.50	**Menopausa precoce iatrogena e comorbilità, sessuali e non** *Alessandra Graziottin (Milano)*
09.50 - 10.10	**Steroidi sessuali e neurobiologia del cervello femminile** *Giovanni Biggio (Cagliari)*
10.10 - 10.30	**Menopausa precoce, insonnia, ansia e depressione** *Claudio Mencacci (Milano)*
10.30 - 11.00	**Discussione**
11.00 - 11.30	**Coffee break**
11.30 - 12.30	**SIMPOSIO:** **MENOPAUSA PRECOCE IATROGENA, SALUTE GENITALE E FERTILITÀ** *Moderatori: Vincenzina Bruni, Anna Maria Paoletti, Eleonora Porcu*
11.30 - 11.50	**Menopausa precoce e salute vulvovaginale** *Filippo Murina (Milano)*
11.50 - 12.10	**Menopausa precoce e fertilità, dalla crioconservazione all'ovodonazione** *Eleonora Porcu (Bologna)*
12.10 - 12.30	**Discussione**
12.30 - 13.45	**SIMPOSIO:** **MENOPAUSA PRECOCE, SALUTE OSTEOARTICOLARE E DOLORE** *Moderatori: Marco Gambacciani, Maria Adele Giamberardino, Filippo Murina*
12.30 - 12.50	**Sarcopenia: diagnosi e prospettive terapeutiche** *Anna Maria Paoletti (Cagliari)*
12.50 - 13.10	**Menopausa precoce e artrosi aggressiva** *Alessandra Graziottin (Milano)*
13.10 - 13.30	**Menopausa precoce, vitamina D, salute ossea, e non solo** *Marco Gambacciani (Pisa)*
13.30 - 13.45	**Discussione**
13.45 - 14.30	**Lunch**

14.30 - 16.10	**SIMPOSIO:** **MENOPAUSA PRECOCE: LE VULNERABILITÀ EMERGENTI** *Moderatori: Claudio Crescini, Alessandra Graziottin, Vincenzo Stanghellini*
14.30 - 14.50	**Ormoni sessuali e salute gastrointestinale: impatto della menopausa precoce** *Vincenzo Stanghellini (Bologna)*
14.50 - 15.10	**Menopausa precoce e vulnerabilità al dolore: basi fisiopatologiche e implicazioni cliniche** *Maria Adele Giamberardino (Chieti)*
15.10 - 15.30	**Menopausa precoce, rischio metabolico e salute cardiovascolare** *Marco Gambacciani (Pisa)*
15.30 - 15.50	**Menopausa precoce e problematiche urologiche (D-mannosio)** *Daniele Grassi (Modena)*
15.50 - 16.10	**Discussione**
16.10 - 16.30	**Coffee break**
16.30 - 18.30	**SIMPOSIO:** **MENOPAUSA PRECOCE E TERAPIE, SOSTITUTIVE E NON, A LUNGO TERMINE** *Moderatori: Franca Fruzzetti, Fabio Landoni, Tommaso Simoncini*
16.30 - 16.50	**Estroprogestinici verso ormoni bioidentici: quando, a chi e perché** *Franca Fruzzetti (Pisa)*
16.50 - 17.10	**DHEA, testosterone: il ruolo degli androgeni dopo menopausa precoce** *Tommaso Simoncini (Pisa)*
17.10 - 17.30	**Menopausa precoce: il ruolo della psicoterapia** *Chiara Micheletti (Milano)*
17.30 - 17.45	**Acido ialuronico: implicazioni per la salute della donna** *Claudio Gustavino (Genova)*
17.45 - 18.00	**Ruolo degli integratori in post menopausa precoce** *Dania Gambini (Milano)*
18.00 - 18.30	**Discussione**
18.30	**Conclusioni e Valutazioni ECM**

INDICE

Acido ialuronico: aspetti farmacologici e clinici pag. 115

Nuovi sviluppi della diagnosi prenatale: implicazioni cliniche, limiti attuali, prospettive future pag. 124

Acido alfa lipoico: farmacologia e indicazioni cliniche pag. 131

Palmitoiletanolamide: ruolo endogeno, profilo farmacologico ed evidenze sull'efficacia clinica pag. 147

Estriolo: profilo farmacologico e clinico con focus sulla vagina pag. 161

Estriolo: profilo farmacologico e clinico con focus sulla vescica pag. 181

Estradiolo e drospirenone per il trattamento di sintomi e segni menopausali. Evidenze farmacologiche e cliniche pag. 193