

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento
dell'uomo"**

Coordinatore: Prof. Claudio Pignata

Tesi di Dottorato

***"Sterilità di coppia, poliabortività e correlazione con alterazioni
dell'emostasi"***

**Tutore
Prof. Giuseppe De Placido**

**Candidato
Dott.ssa Maristella D'Uva**

Anno Accademico 2006/2007

**DOTTORATO DI RICERCA in RIPRODUZIONE, SVILUPPO E
ACCRESIMENTO DELL'UOMO XIX CICLO**

Titolo della tesi

**Sterilità di coppia, poliabortività e correlazione con alterazioni
dell'emostasi.**

Dottoranda: Maristella D'UVA

Abstract

Background - Thrombophilia is a well known risk factor for female infertility. Several studies are available in the Literature since 1980's underlying the relations between inherited and/or acquired thrombophilia and recurrent pregnancy loss. Yet, recent studies underlined a possible relationship between inherited thrombophilia and repeated in vitro fertilization failures. On the other hand acquired thrombophilia is induced by hormonal treatment based on oral contraceptive use or hormonal treatment directed to controlled ovarian hyperstimulation.

Aim - The aim of this study is to demonstrate the role of thrombophilia in patients affected by unexplained sterility and unexplained recurrent pregnancy loss and in the daily clinical management of patients ongoing screening for female sterility.

Patients and methods - We selected 60 patients directed to our outpatient for clinical management of female infertility. 40 patients was affected by recurrent foetal loss, while 20 patients was referred for unexplained female sterility. As control group we selected 30 subjects without thrombotic episodes in their anamnesis and with one or more successful pregnancy and without gestational complication or miscarriage.

All subject were screened for molecular thrombophilia due to inherited defects (i.e. factor V Leiden gene variant, prothrombin A20210G gene variant and MTHFR C677T gene variant, protein S deficiency, protein C deficiency, AT III deficiency) or acquired causes (i.e. acquired protein C resistance other than factor V Leiden gene variant, hyperhomocysteinemia other than MTHFR

C677T gene variant, increased factor VIII, reduced factor XII, antiphospholipid syndrome).

Results - We reported 2 cases report in which the role of acquired thrombophilia due to oral contraceptive use trigger a superior mesenteric vein thrombosis and another one in which an acute carotid thrombosis was triggered by ovarian hyperstimulation syndrome. On the other hand a review in which the role of thrombophilia in women affected by recurrent pregnancy loss was performed and 2 editorial comments was provided. One of them was based on therapeutic role of antithrombotic treatment based on low molecular weight heparin in thrombophilic women affected by recurrent pregnancy loss. The second one explained the state of the art for the diagnosis of ovarian vein thrombosis. Moreover we identified a possible role of d-dimer for the fast identification of thrombophilia in women ongoing a screening for infertility. Furthermore, the role of hyperhomocysteinemia not only in women affected by recurrent pregnancy loss but also in women affected by unexplained female sterility was described for the first time in our data.

Conclusion - In conclusion our data confirmed several aspect of inherited, acquired and combined thrombophilia in several clinical settings of women ongoing screening of infertility but open also a new perspectives for the daily clinical management of this kind of patients in particular for the screening of hypercoagulable state and hyperhomocysteinemia. These data may be relevant in next years also for possible therapeutic aspects in this clinical setting.

Indice

Parte 1 – Premessa.	6
1. Sterilità di coppia.	6
1.1. Epidemiologia della sterilità di coppia	6
1.2. Cause di sterilità	7
1.3. Cause di sterilità femminile.	7
2. Abortività ricorrente.	9
2.1. Cause di Abortività ricorrente.	10
3. La trombosi e la trombofilia.	11
3.1 Gli inibitori naturali della coagulazione	15
3.2 Carenze degli anticoagulanti naturali e trombosi.....	17
3.3 Gli stati trombofilici congeniti.	18
3.4 Iperomocisteinemia e patologia trombotica.	20
Parte 2 – Linee di ricerca.	23
1. Poliabortività e alterazioni dell'emostasi.	23
2. Sterilità femminile e alterazioni dell'emostasi.	26
3. Scopo della ricerca.	26
Parte 3 – Pazienti e metodi.	27
1. Selezione delle pazienti.	27
2. Metodi.	29
3. Gruppo controllo.	31
Parte 4 – Risultati.	32
P Di Micco, M D'Uva et al. Thromb Haemost 2003; 90: 957-60	32
P Di Micco, M D'Uva, et al. Journal of Translational Medicine 2004; 2: 38	33
P Di Micco, M D'Uva. Thromb Haemost 2005; 94: 897-898	35
M D'Uva, I Strina, et al. Journal of Translational Medicine 2005; 3: 43	36
P Di Micco, M D'Uva. Thromb Haemost 2006; 96: 109-110	38
B Oliviero, M D'Uva, et al. Clin Lab 2007; 53: 167-171	40
P Di Micco, M D'Uva, et al. Clin Lab 2007; 53: 309-314	42
M D'Uva et al. Thrombosis Journal 2007 ; 5 : 10	43
Parte 5 - Discussione.	44
Bibliografia.	47
Tabelle.	53

Parte 1 – Premessa.

1. Sterilità di coppia.

La **sterilità di coppia** è quella condizione in cui vi sia assenza di concepimento dopo un anno di rapporti sessuali frequenti e non protetti (1).

In tale definizione viene sottolineata l'importanza di due fattori: il tempo e la frequenza coitale. Per quanto riguarda il limite temporale di almeno un anno, studi sulla fertilità naturale della specie umana hanno dimostrato come, anche in assenza di condizioni patologiche, la probabilità di ottenere un concepimento che esiti nella nascita di un bambino vivo, entro un ciclo mestruale, sia solo del 25%; probabilità che aumenta fino al 72% dopo sei mesi, e che diviene pari all'80-90% dopo un anno (1). Per quanto riguarda la frequenza coitale, è stato dimostrato come la probabilità di concepimento sia pari al 15% nelle coppie che abbiano rapporti con frequenza settimanale e dell'83% nelle coppie con quattro o più rapporti settimanali (1).

Vale infine la pena ricordare come anche la variabile età (in particolar modo quella femminile) incida significativamente sulla sterilità di coppia. Innumerevoli studi hanno dimostrato in modo inequivocabile come vi sia una riduzione statisticamente significativa della fertilità femminile con l'avanzare dell'età e come il trentacinquesimo anno di età rappresenti per la donna un limite oltre il quale si verifica una irreversibile e progressiva riduzione della fertilità.

Si è soliti parlare di **sterilità primaria** quando la coppia non ha mai ottenuto una gravidanza, di **sterilità secondaria** quando la coppia ha riportato almeno una gravidanza a termine. Infine, per **infertilità**, si intende l'incapacità di proseguire la gravidanza fino ad un'epoca di vitalità del feto (2-3).

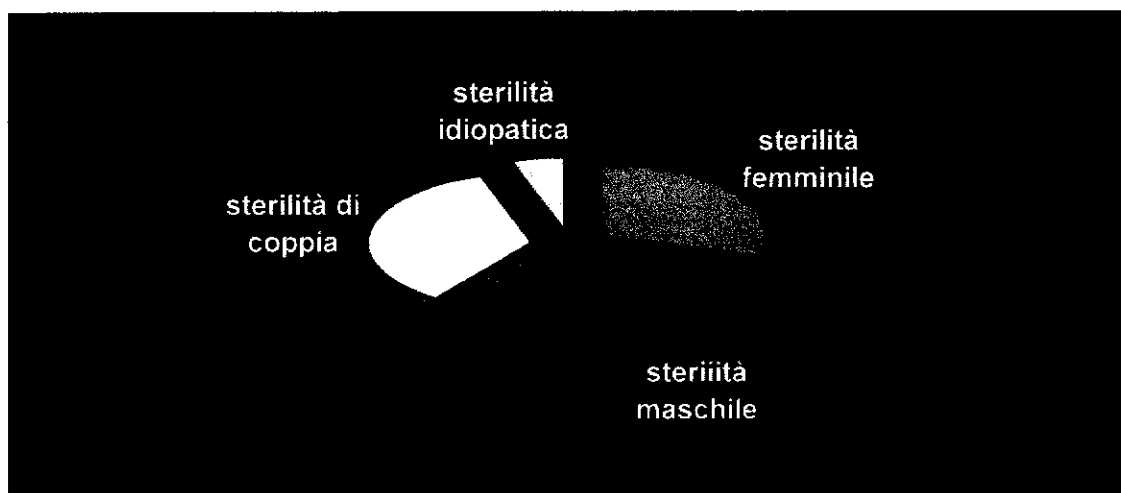
1.1. Epidemiologia della sterilità di coppia

Dal punto di vista epidemiologico, si ritiene che attualmente oltre il 15% delle coppie sia affetto da problematiche di sterilità o di infertilità. Negli ultimi 20 anni il tasso di coppie sterili ha subito un incremento notevole.

Una delle principali motivazioni che ha contribuito a tale aumento è da ricercarsi nella tendenza sempre più frequente a procrastinare l'età del matrimonio, laddove, come precedentemente detto, la fertilità (in particolar modo quella femminile) si riduce sensibilmente e progressivamente con l'età (1).

1.2. Cause di sterilità

Le cause della sterilità possono essere legate ad una condizione patologica della donna, dell'uomo o di entrambi. Pertanto si distinguono: una **sterilità femminile** (35% dei casi), una **sterilità maschile** (35% dei casi) ed una **sterilità di coppia** (30% dei casi). Tuttavia, in alcuni casi non è possibile identificare alcun fattore capace di interferire con la capacità riproduttiva della coppia; si parla in tali casi di **sterilità idiopatica o da causa inspiegata** (5% dei casi) (1).



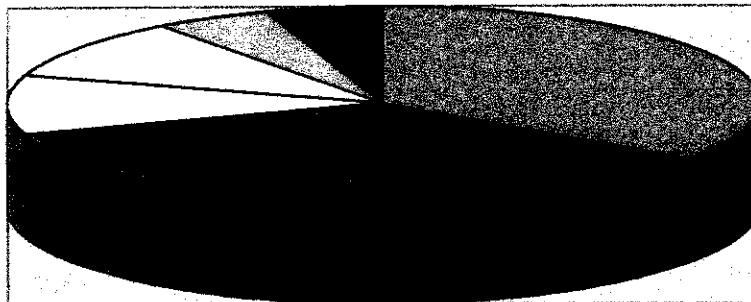
1.3. Cause di sterilità femminile.

La sterilità femminile può essere dovuta ai seguenti fattori:

- **Alterazioni endocrine** (30-40% casi): comprendono tutte quelle condizioni in cui vi sia la mancanza dell'ovulazione (sindrome dell'ovaio policistico, iperprolattinemia, distiroidismi, diabete mellito), insufficienza del corpo luteo e quelle affezioni (disendocrinie extra-genitali e

- dismetaboliche) capaci di interferire con la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (sindrome di Cushing, ipo- e iper-tiroidismo) (1-2).
- **Alterazioni vaginali** (5%): alterazioni anatomiche (malformazioni vaginali quali agenesia, presenza di setti e stenosi), infiammatorie e infettive (vaginiti) e funzionali (vaginismo e dispareunia) (1-2).
 - **Alterazioni immunologiche** (1-5%): alterazioni della risposta immunitaria nell'ambito della coppia possono interferire con la fertilità a vari livelli: transito degli spermatozoi lungo le vie genitali femminili; fecondazione; fasi precoci dello sviluppo embrionale. Le forme più frequenti sono caratterizzate dalla presenza di anticorpi rivolti contro antigeni spermatici sia nel liquido seminale (auto-immunizzazione maschile), sia nel sangue e nel muco cervicale della partner (iso-immunizzazione femminile) (1-2).
 - **Alterazioni tubo-peritoneali** (35% casi): comprende le alterazioni anatomiche e funzionali a carico delle tube e le modificazioni di natura fisica, chimica o meccanica che si realizzano all'interno della cavità pelvica. Rientrano in tale categoria la patologia tuberica primitiva (processi infiammatori acuti e cronici, malformazioni), l'endometriosi e tutte quelle condizioni responsabili della formazione di aderenze peritubariche che, dislocando e comprimendo le tube, ne compromettono la funzionalità (la stessa endometriosi, infiammazioni degli organi pelvici, pregressi interventi laparotomici, precedenti gravidanze ectopiche) (1-2).
 - **Alterazioni uterino-endometriali** (5-10%): comprende le malformazioni dell'apparato genitale (agenesia uterina, utero setto, utero bicorni, ecc.), i processi infiammatori a carico dell'endometrio (endometriti), le patologie endouterine (miomi e polipi endometriali che si accrescono nella cavità uterina; presenza di processi aderenziali che alterano la cavità uterina) (1-2).
 - **Alterazioni cervicali** (5-15%): alterazioni anatomiche (ipoplasia e stenosi), infiammatorie ed infettive (cerviciti) e funzionali (carenza muco cervicale) della cervice uterina possono determinare una inadeguata

interazione tra il seme del partner maschile e il microambiente del tratto genitale femminile a livello cervicale (1).



■	fattore endocrino
■	fattore tubo-peritoneale
□	fattore uterino
▨	fattore cervicale
▩	fattore vaginale
■	fattore immunologico

2. Abortività ricorrente.

Per **abortività ricorrente** si intende la presenza anamnestica di due o più episodi abortivi spontanei consecutivi in una coppia, secondo alcuni Autori, o di tre o più aborti consecutivi secondo altri. Comunemente il termine viene oggi utilizzato in entrambe le accezioni (4). La ricerca di eventuali cause di aborto si impone già dopo il secondo aborto. La ricerca con metodiche diagnostiche è infatti raccomandata dopo ripetuti episodi abortivi con epoca gestazionale < 10 settimane oppure già dopo un unico episodio abortivo con età gestazionale > 10 settimane. I dati della Letteratura indicano che il rischio di ripetizione di un episodio abortivo dopo un primo evento è pari al 13.5%, ma aumenta al 24% dopo 2 episodi e al 33% dopo tre eventi (4).

Dal punto di vista eziopatogenetico possiamo distinguere diversi fattori di rischio, tuttavia in un'alta percentuale di casi la causa della abortività ripetuta rimane inspiegata (4).

Si possono distinguere cause genetiche, cause endocrine, cause anatomiche, cause infettive, cause immunologiche / infiammatorie croniche, cause ematologiche con alterazioni specifiche dell'emostasi.

2.1. Cause di Abortività ricorrente.

- **Cause genetiche.** L'incidenza delle cause genetiche varia nelle diverse casistiche con percentuali variabili sino al 40-60% (5). Possiamo distinguere anomalie cromosomiche quali trisomie, aneuploidie, monosomie, aberrazioni strutturali e specifiche alterazioni geniche (polimorfismi genetici); nuovi dati disponibili nella Letteratura inoltre, sottolineano un potenziale ruolo causale di "imprinting genomico" e il mosaicismo del cromosoma X (4).
- **Cause anatomiche.** L'incidenza delle cause anatomiche varia nelle casistiche con percentuali variabili tra il 10% e 30%. Possiamo anche distinguere diverse condizioni quali anomalie anatomiche congenite con malformazioni uterine (utero unicorne, utero setto, utero didelfo, utero bicorne) e anomalie acquisite (incontinenza cervicale, sinechie endouterine, leiomiomi sottomucosi) (4).
- **Cause endocrine.** L'incidenza delle cause endocrine varia nelle casistiche con percentuali variabili tra il 10% e 20% (5). Possiamo riconoscere cause endocrine di abortività ripetuta quali deficit di fase luteale, iperprolattinemie, sindrome dell'ovaio policistico, distiroidismi, diabete mellito metabolicamente non compensato) (4).
- **Cause infettive.** L'incidenza delle cause infettive varia nelle casistiche con percentuali intorno al 5%. Attualmente un ruolo patogenetico sembra essere riconosciuto a infezioni da *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma spp* (5).
- **Cause immunologiche.** L'incidenza delle cause immunologiche varia nelle casistiche con percentuali molto variabili. Dal punto di vista patogenetico tali patologie inducono processi flogistici cronici con possibile coinvolgimento autoimmunitario. Le patologie più comunemente coinvolte nelle poliabortività sono il Lupus eritematoso sistemico, la sclerosi sistemica, sindromi da anticorpi antifosfolipidi secondarie a patologia autoimmunitaria, morbo celiaco. E' stata inoltre segnalata da diversi Autori la possibilità di episodi abortivi in donne con

isolata positività degli anticorpi antinucleo (ANA) con titolazione quantitativa variabile (4).

- **Cause psicologiche.** L'incidenza delle cause psicologiche è estremamente variabile non essendo tutt'ora accettata da tutti i gruppi di Ricerca.
- **Cause ambientali.** Anche l'incidenza delle cause ambientali è estremamente variabile e tutt'ora non accettata da tutti i gruppi di Ricerca. Potenziale ruolo è stato attribuito a fumo di sigaretta, utilizzo di farmaci, abuso di caffè, alcool e sostanze psicoattive.
- **Cause ematologiche.** Nell'ultimo ventennio i dati della letteratura hanno mostrato un ruolo patogenetico specifico nella abortività ricorrente delle alterazioni dell'emostasi con tendenza alla trombofilia e all'ipercoagulabilità. Anche qui l'incidenza di tali alterazioni è estremamente variabile nelle casistiche disponibili nella Letteratura per differenti criteri di inclusione e esclusione delle pazienti studiate.

3. La trombosi e la trombofilia.

Mentre è noto da secoli che difetti congeniti della coagulazione del sangue causano malattie emorragiche come l'emofilia, è solo da qualche decennio che si conoscono cause ereditarie di trombosi (trombofilia ereditaria).

Le manifestazioni cliniche della patologia trombotica si possono presentare sia a livello dei vasi venosi (trombosi venosa) che dei vasi arteriosi (trombosi arteriosa).

La trombosi può verificarsi in assenza di cause scatenanti (primitiva o idiopatica) o in presenza di fattori di rischio (secondaria) (6,7).

La patologia trombotica venosa ha un'incidenza di 1/1000 persone /anno nella popolazione generale dei paesi occidentali e una prevalenza di 1/100 persone/anno nella popolazione selezionata per nuovi eventi clinici di trombosi venosa. Tale frequenza è pari alla frequenza di patologia trombotica arteriosa sebbene questa stessa presenti anche altri fattori di rischio (ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, età, dislipidemie, diabete mellito)

che alterano la parete vascolare facilitando il processo aterosclerotico e quindi l'aterotrombosi.

Per tali motivi la patogenesi delle trombosi ereditarie viene comunemente associata alla patogenesi della trombosi venosa sebbene siano note manifestazioni trombotiche ereditarie del versante arterioso. Numerosi studi infatti sono soliti riportare e sottolineare il ruolo dei fattori di rischio trombotico prevalentemente per la trombosi venosa, sebbene questi stessi siano coinvolti anche nella patogenesi della trombosi arteriosa.

L'osservazione di episodi tromboembolici venosi ricorrenti in alcune famiglie, soprattutto in età giovanile in soggetti della medesima famiglia ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di uno stato di trombofilia.

La **trombofilia ereditaria** viene definita come la tendenza, determinata da cause genetiche, alla trombosi venosa, che tipicamente è caratterizzata dalla familiarità, dalla comparsa di eventi in età giovanile (prima dei 40-45 anni), dalla mancanza di altre cause e dalla tendenza a recidivare. Come già detto i pazienti affetti da trombofilia possono, sia pure più raramente, sviluppare anche episodi di trombosi arteriosa.

Dal punto di vista patogenetico la trombosi è il risultato di un'alterazione dell'equilibrio tra forze protrombotiche e antitrombotiche a livello del flusso sanguigno, e di un disturbo dell'interazione tra sangue e parete endoteliale. Già nel 1856 R. Virchow (8) diede la prima definizione patogenetica della trombosi descrivendo i tre eventi di perturbazione dell'omeostasi vascolare responsabili della formazione del trombo:

1. alterazione del flusso sanguigno (stasi o turbolenza)
2. alterazione dello stato di coagulabilità del sangue (ipercoagulabilità)
3. danno della parete vasale (endotelio)

Gli studi di biologia cellulare, di biochimica e di biologia molecolare hanno migliorato e approfondito le nostre conoscenze in merito alla patogenesi degli eventi trombotici, ma hanno confermato i capisaldi della triade di Virchow, che risulta valida tutt'oggi.

Sebbene le trombosi arteriose e quelle venose abbiano una patogenesi lievemente diversa, in entrambe è comune uno stato di squilibrio nel sistema della coagulazione con una conseguente **ipercoagulabilità** (9-12).

Il sistema della coagulazione è un complesso enzimatico costituito da una cascata di attivazione di zimogeni inattivi, regolato da cofattori e da inibitori, che giocano un ruolo fondamentale nell'emostasi, indispensabile per il mantenimento dell'integrità vascolare e per un corretto flusso sanguigno all'interno dei vasi.

Tradizionalmente si è soliti indicare 2 differenti vie di attivazione della coagulazione:

- la via della fase di contatto o via intrinseca
- la via del complesso fattore VII attivato-fattore tissutale o via estrinseca.

Studi sul meccanismo di attivazione "in vivo" della coagulazione hanno dimostrato che la via del complesso fattore VII attivato-fattore tissutale è la principale via di generazione del fattore X attivato (fattore Xa). Il complesso fattore X attivato-fattore tissutale infatti può attivare sia direttamente che indirettamente il fattore X, mediante proteolisi del fattore IX, saltando i fattori del sistema di contatto. La trombina così generata può attivare a sua volta i fattori XI, IX e VIII, promuovendo un'amplificazione della cascata della coagulazione con la proteolisi del fibrinogeno in fibrina (13-15).

Il sistema della coagulazione è, a sua volta, regolato da un sistema di elementi ad attività anticoagulante, come la antitrombina III, il sistema proteina C-proteina S e il sistema di inibizione del fattore tissutale. Il ruolo esercitato da tali proteine è quello di autoregolare l'attivazione della cascata coagulativa per evitare stati di ipercoagulabilità. La perturbazione dell'equilibrio tra questi elementi a funzione anticoagulante e i fattori ad azione procoagulante con uno sbilanciamento a favore degli elementi procoagulanti determina uno stato di ipercoagulabilità.

Negli ultimi anni sono state identificate numerose alterazioni molecolari dell'emostasi responsabili dello stato di trombofilia e della conseguente ipercoagulabilità (tabella 1). Inoltre, esistono diverse situazioni cliniche (tabella 2) che sono frequentemente associate con un aumentato rischio di

tromboembolismo venoso, in quanto caratterizzate da stasi venosa e danno endoteliale.

Queste condizioni patogenetiche non si escludono reciprocamente, ma spesso interagiscono nel determinare la ipercoagulabilità e successivamente la trombosi: i pazienti con trombofilia sono infatti particolarmente a rischio qualora siano esposti ad una condizione clinica di aumentato rischio tromboembolico (ad esempio gli interventi di chirurgia maggiore e il decorso clinico post-operatorio). La stasi venosa, determinata dall'allettamento post-operatorio, è in grado di provocare sofferenza endoteliale da ipossia e quindi di neutralizzare la fisiologica attività anticoagulante dell'endotelio e la sua capacità di mantenere un perfetto equilibrio tra forze protrombotiche ed antitrombotiche. Infatti la barriera endoteliale, se integra, impedisce l'attivazione piastrinica e l'interazione tra piastrine e matrice subendoteliale; essa è in grado di produrre fisiologicamente ossido nitrico e prostaciclina, potenti inibitori dell'attività piastrinica, è in grado di ridurre la trasformazione delle proteine procoagulanti da zimogeni inattivi a forme attive, sbarrando il contatto con la superficie fosfolipidica indispensabile per l'interazione tra i fattori coagulativi, e garantisce inoltre una corretta attivazione delle proteine anticoagulanti come la proteina C.

All'eccessiva, impropria o inopportuna attivazione del sistema della coagulazione, fa seguito dapprima lo stato di ipercoagulabilità e successivamente la formazione di un trombo cui clinicamente corrisponde un episodio trombotico.

Numerosi studi recentemente pubblicati hanno confermato che nei soggetti sani c'è, in vivo, una continua modesta attivazione del sistema emostatico anche in assenza di stimoli trombogenici (16-17). Tuttavia tale attivazione non riesce ad arrivare alla soglia di manifestazione clinicamente rilevabile grazie all'attività di **feed-back** negativo esercitata dei cosiddetti anticoagulanti naturali.

3.1 Gli inibitori naturali della coagulazione

I tre principali meccanismi anticoagulanti naturali in vivo sono:

- 1) il sistema glicosaminoglicani-antitrombina
- 2) il sistema Proteina C-trombomodulina-proteina S;
- 3) sistema di inibizione del fattore tissutale.

- *Sistema glicosaminoglicani-antitrombina.*

L'antitrombina III (AT III) è un inibitore delle serin-proteasi con maggiore affinità per la trombina. E' sintetizzata negli epatociti, ha un P.M. di 58 KD ed è presente nel sangue ad una concentrazione di 140 microg/dl. Oltre alla trombina è in grado di inibire altre serin-proteasi del sistema emostatico, quali i fattori XIIa, XIa, IXa e Xa e sembra capace di inibire il complesso fattore VIIa-TF (18-25).

Il legame tra AT III e trombina è accelerato circa 1.000 volte dalla presenza di eparina e/o sostanze eparinosimili prodotte in vivo dai mastociti dell'apparato gastroenterico e polmonare e presenti a livello della parete vascolare endoteliale. L'eparina funge da catalizzatore anche per l'attività di altre serin-proteasi inibite dalla AT III, soprattutto del fattore IXa. Analogo effetto ha l'eparan solfato, un proteoglicano prodotto dalle cellule endoteliali.

- *Il sistema Proteina C-trombomodulina-Proteina S.*

La Proteina C è una glicoproteina con P.M. di 69 kD, è vitamina K dipendente, viene prodotta dagli epatociti ed è presente nel plasma ad una concentrazione di 4 microg/dl (26-28). Circola nel sangue sotto forma di zimogeno inattivo. Ha un'azione anticoagulante solo nella sua forma attivata aPC (proteina C attivata): agisce inattivando i fattori Va e VIIIa e quindi in ultima analisi il fattore Xa.(29-31) L'enzima responsabile della conversione della Proteina C nella sua forma attivata è la trombina che in vivo, legandosi alla trombomodulina, presente sulla superficie endoteliale, accelera ben 10.000 volte la reazione, facilitando l'attivazione della proteina C. In sintesi la trombina prodotta dall'attivazione del sistema della coagulazione esercita

anche un'azione di controllo retrogrado su un'eccessiva attivazione del sistema attivando un anticoagulante naturale (32).

Cofattore di questa serie di reazioni è la proteina S: anch'essa è una glicoproteina, vitamina k dipendente, con P.M. 69 kD, viene prodotta dagli epatociti e dalle cellule endoteliali, è presente nel plasma ad una concentrazione di 23 microg/dl, in due forme: una quota libera attiva e una quota inattiva legata a un altro regolatore del sistema, la C4 binding protein. Anche la proteina S è in grado, legandosi con la proteina C attivata, di accelerare il clivaggio del fattore V e del fattore VIII (33-35).

- *L'inibitore della via del Fattore Tissutale (TFPI).*

Un sistema anticoagulante naturale con un potenziale ruolo nella regolazione della trombogenesi in vivo è il TFPI (tissue factor pathway inhibitor=il sistema di inibizione del Fattore Tissutale).

Il TFPI è una proteina composta da 276 aminoacidi, sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai megacariociti. Ha un P.M. di 40 KD ed è presente nel plasma sotto quattro forme ad una concentrazione totale di 100ng/ml (36-38).

1. il 75% è legato alla superficie endoteliale ed è rilasciato in circolo in seguito all'infusione di eparina (frazione "heparin releasable");
2. il 20% circola legato alle proteine plasmatiche;
3. circa il 3% circola in forma libera;
4. il restante 2 % è contenuto nelle piastrine e rilasciato in seguito a stimolazione da parte di agonisti come la trombina.

Il TFPI inibisce sia l'interazione tra Fattore VII e TF sia l'attivazione del fattore X da parte del prodotto di questa interazione: pertanto il TFPI esercita una funzione cruciale nel mantenere l'endotelio vascolare in uno stato di resistenza alla trombosi (39).

A differenza degli altri anticoagulanti naturali, non è stato finora descritto uno stato di carenza ereditaria di TFPI associato con un aumentato rischio tromboembolico.

3.2 Carenze degli anticoagulanti naturali e trombosi.

- *Carenza di antitrombina III.*

La potente azione anticoagulante dell'AT III giustifica l'incidenza di trombosi del sistema venoso nei soggetti con carenza congenita o acquisita di AT III, descritta per la prima volta nel 1970: questo difetto è trasmesso con carattere autosomico dominante e nella forma eterozigote ha una prevalenza variabile dall'1 al 3% tra i soggetti con trombosi venose idiopatiche e dello 0.3% nella popolazione generale. Nel difetto di tipo I (deficit antigenico e funzionale) si stima che approssimativamente la metà dei membri di una famiglia affetta vada incontro ad un episodio tromboembolico venoso prima dei 25 anni (40-41).

Esistono anche forme acquisite di deficit di AT III, secondarie a sindrome nefrosica (42), a grave insufficienza epatica, a coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (43) o ad uso di estroprogestinici (44-45).

- *Carenza di proteina C e proteina S.*

I deficit congeniti di proteina C e proteina S, scoperti rispettivamente nel 1981 e nel 1984, sono trasmessi con modalità autosomica dominante e possono essere quantitativi e qualitativi (tipo I) oppure solo quantitativi (tipo II).

Si stima che la carenza di proteina C si aggiri sullo 0.5 % nella popolazione generale e dal 3 al 5% in coorti di pazienti con trombosi. I soggetti eterozigoti hanno una probabilità del 50% di aver un evento tromboembolico venoso entro i 45 anni, con un rischio relativo per un primo episodio stimato tra 8 e 11 (46-48).

La carenza di proteina S in coorti di pazienti con trombosi si aggira intorno al 2% circa, ma non ne conosciamo la prevalenza nella popolazione generale. Il rischio relativo per episodi tromboembolici venosi è stimato essere approssimativamente di 10 (49-50).

Esistono anche carenze degli anticoagulanti naturali di tipo acquisito: deficit di proteina C di grado variabile si associano a epatopatia con grave difetto di

sintesi, a sindrome da coagulazione intravascolare disseminata (DIC), a sindrome da distress respiratorio dell'adulto o a stato postoperatorio (51-53). Deficit di proteina S può essere riscontrato in pazienti in terapia estroprogestinica (pillola anticoncezionale), gravidanza, o DIC (54-55) Stati di carenza acquisita di Proteina S possono essere correlati ad aumentati livelli plasmatici di C4 binding protein, una proteina della fase acuta dell'infiammazione (56).

3.3 Gli stati trombofilici congeniti.

- *La Resistenza alla proteina C attivata e il fattore V Leiden.*

Nell'ambito degli studi sulle alterazioni del sistema emostatico correlate alla trombofilia la scoperta più significativa è stata l'identificazione di un difetto nella risposta anticoagulante della proteina C attivata (Resistenza alla proteina C attivata: APC-R), descritto per la prima volta da Dahlback nel 1993 (57-58). La proteina C è una serin-proteasi vitamina K dipendente attivata dal complesso trombina-trombomodulina sulla superficie delle cellule endoteliali. Una volta attivato, l'enzima degrada i fattori Va e VIIIa, esplicando così la sua attività anticoagulante. L'APC-R è la causa di circa il 21 % delle trombosi venose profonde nei soggetti con età inferiore ai 70 aa, e di circa il 50 % delle trombosi venose familiari.

Il difetto molecolare responsabile di oltre il 95% dei casi di APC-R (59), è una mutazione puntiforme in posizione 1691 dell'esone 10 del gene che codifica per il fattore V che determina la sostituzione di una arginina con una glutammina nel sito di clivaggio del fattore V ad opera della proteina C attivata. Il fattore V così alterato (fattore V mutante o Leiden) non può essere degradato dalla proteina C attivata stessa, per cui conserva la sua attività procoagulante e determina uno stato di ipercoagulabilità.

Il Fattore V mutante (fattore V Arg506Gln) è la più comune tra le cause, congenite o acquisite, di trombofilia nella popolazione generale, dove si calcola abbia una prevalenza variabile a seconda delle popolazioni dal 2 al 5 % (60). Esso è associato ad un aumentato rischio trombotico ed è stato trovato in circa il 50% delle famiglie selezionate con trombofilia e in circa il

20% dei pazienti consecutivi con trombosi. Nella sua forma eterozigote aumenta il rischio dei portatori di sviluppare una trombosi di circa 7 volte. Il rischio di trombosi nei soggetti omozigoti è invece aumentato di circa 80 volte e la maggior parte dei portatori sviluppa almeno un episodio di trombosi durante la propria vita. L'espressione del fenotipo è altamente variabile e in genere le manifestazioni cliniche non sono così gravi come nei deficit degli anticoagulanti naturali (proteina C, proteina S ed antitrombina III) (61). Tuttavia, è chiaro che la presenza di fattori di rischio ambientali come un intervento chirurgico, la gravidanza e soprattutto la terapia estroprogestinica aumentano il rischio di sviluppare una trombosi nei pazienti con APC-R (62).

Controverso è invece a tutt'oggi il ruolo del fattore V mutante nella patogenesi delle trombosi arteriose (63). Alcuni studi recentemente pubblicati hanno dimostrato che non c'è un incremento significativo delle trombosi arteriose in questi pazienti. Al contrario, un recente studio sui pazienti eterozigoti ha documentato un aumento del rischio di eventi ischemici cerebrali in questi soggetti (64). Inoltre, il fattore V Leiden è considerato un fattore di rischio per stroke nei bambini, negli adolescenti e persino nei soggetti con emofilia.

- *Polimorfismo genetico della Protrombina A20210G.*

Un'altra causa di ipercoagulabilità secondaria è la mutazione del gene che codifica per la protrombina (fattore II), caratterizzata dalla sostituzione di una guanina con un'adenosina nella posizione 20210 della regione 3' del gene che codifica per la protrombina, scoperta nel 1996 dallo stesso gruppo olandese, che aveva identificato nel fattore V mutato la causa della resistenza alla proteina C attivata (65-66). Tale polimorfismo è stato trovato nel 18% dei pazienti selezionati con una storia personale o familiare per trombosi venose, nel 6.2 % dei pazienti con un primo episodio di trombosi venosa profonda non selezionati e nel 2.3 % della popolazione caucasica sana.

Confrontati con i soggetti non affetti, i soggetti eterozigoti per la mutazione hanno un rischio di trombosi circa 3 volte maggiore.

E' da notare che la sostituzione nucleotidica non comporta alcuna sostituzione aminoacidica nella molecola della protrombina, perchè si trova nella zona non codificante del gene. Il meccanismo responsabile è stato chiarito solo in parte, in quanto tale polimorfismo genetico si associa ad un'aumentata attività del promotore che frequentemente determina livelli plasmatici elevati di protrombina, che a loro volta potrebbero aumentare i livelli di trombina.

Anche la mutazione della protrombina ha una prevalenza nella popolazione generale assai alta e tipica di un poliformismo (0.3-4%) con un gradiente di distribuzione geografica che appare inverso a quello del fattore V mutato (più frequente nel Sud Europa che nel Nord).

3.4 Iperomocisteinemia e patologia trombotica.

- *Iperomocisteinemia.*

L'omocisteina è un aminoacido solforato presente nel plasma dell'individuo normale in concentrazioni variabili fra 5 e 15 $\mu\text{mol/L}$. Prodotto della metionina attraverso la rimozione di un gruppo metilico, può essere metabolizzato a cisteina mediante un processo di transulfurazione o di nuovo a metionina attraverso un processo di rimetilazione. In queste trasformazioni sono coinvolti tre enzimi: la metilentetrafoloreduttasi (MTHFR), enzima chiave nel ciclo dell'acido folico; la metionina sintetasi, il cui coenzima è la vitamina B12; la cistationina- β -sintetasi (CBS), che utilizza come cofattore enzimatico la vitamina B6. La carenza o anomalità funzionale di questi enzimi e/o la carenza dei loro cofattori vitaminici determinano un difettoso metabolismo dell'aminoacido e quindi il suo accumulo nel plasma in elevate concentrazioni (67).

Partendo dall'osservazione che l'iperomocisteinemia grave (omocistinuria), determinata da carenze omozigoti di cistationina- β -sintetasi e della reduttasi, è associata con eventi tromboembolici arterovenosi,

l'iperomocisteinemia moderata è stata prima ipotizzata e poi dimostrata essere fattore di rischio per trombosi arteriose e venose.

La prevalenza dell'iperomocisteinemia moderata nella popolazione generale è stata stimata essere intorno al 5%, mentre la sua prevalenza nei pazienti giovani con tromboembolismo venoso sembra essere intorno al 15% (68).

Nell'iperomocisteinemia moderata l'attività enzimatica di MTHFR o di CBS può essere ridotta al 50%: la prevalenza di questi difetti enzimatici nella popolazione generale è di circa 0.4-1.5%.

Esiste inoltre la possibilità della presenza di una variante termolabile della MTHFR legata alla presenza del polimorfismo genetico C677T.

Non in tutti i soggetti portatori della mutazione si riscontrano valori moderatamente elevati di omocisteinemia: ciò fa supporre che la loro espressione fenotipica possa essere influenzata da altri fattori, per esempio i livelli sierici di acido folico.

L'iperomocisteinemia acquisita, quindi, può essere causata da deficit di cofattori essenziali per il metabolismo della metionina:

- deficit di folati
- deficit di cobalamina (vitamina B12)
- deficit di piridossina (vitamina B6)

e da

- insufficienza renale cronica
- dall'utilizzo di alcuni farmaci

Alcuni farmaci interferiscono con il metabolismo dei folati come il methotrexate e gli anticonvulsivanti, della cobalamina come l'ossido nitrico e della vitamina B6 come la teofillina: essi possono causare iperomocisteinemia moderata. Gli estrogeni, il tamoxifene, la penicillamina e l'acetilcisteina riducono invece i livelli plasmatici di omocisteina.

- *Iperomocisteinemia e trombosi.*

I meccanismi attraverso cui gli aumentati livelli plasmatici di omocisteina determinano uno stato trombofilico con manifestazioni trombotiche venose e arteriose non sono ancora ben chiari. Studi sperimentali *in vivo* hanno

evidenziato una eccessiva attivazione dei meccanismi procoagulanti della cellula endoteliale, l'inibizione del meccanismo anticoagulante della proteina C attivata e della trombomodulina, l'inibizione di meccanismi di vasodilatazione e aggregazione piastrinica come quelli della prostaciclina e del nitrossido (68).

Parte 2 – Linee di ricerca.

1. Poliabortività e alterazioni dell'emostasi.

La poliabortività si può identificare come una delle principali cause di infertilità di coppia. Uno studio del 1999 (69) ha identificato la trombofilia congenita e/o acquisita in almeno il 50% delle donne affette da poliabortività.

La trombofilia sembra inoltre poter influenzare non solo la sterilità di coppia, ma anche in caso di gravidanza ottenuta, l'outcome della gravidanza stessa, in particolare se riferita a complicazioni quali l'insufficienza placentare, la preeclampsia, il ritardo di crescita intrauterino, abruptio placentae, morte fetale inspiegabile, abortività tardiva (70,71,72,73,74).

Si possono clinicamente distinguere due diversi stati di ipercoagulabilità: quello subclinico e l'ipercoagulabilità clinicamente evidente (trombosi).

La metodologia diagnostica della trombofilia non può prescindere dalla medicina di laboratorio che mette a disposizione del clinico test specifici e volti a identificare marcatori di trombofilia genetici e/o acquisiti (73-75-76-77).

Gli stati di ipercoagulabilità associati alle patologie trombotiche sono dimostrabili frequentemente grazie a specifici test di laboratorio di tipo quantitativo come il d-dimero, il fibrinopeptide A, il frammento protrombinico 1+2. Comunemente in pratica clinica il test più utilizzato è il d-dimero per la sua semplicità di esecuzione, per la varietà dei test qualitativi e quantitativi disponibili e per un discreto vantaggio costo\benefici.

Il d-dimero rappresenta dal punto di vista patogenetico uno dei prodotti di degradazione della fibrina non stabilizzata e la sua presenza in dosi elevate nel plasma dei soggetti analizzati identifica quindi una eccessiva produzione di fibrina. Nella comune pratica clinica l'analisi quantitativa del d-dimero rappresenta un test sensibile di facile esecuzione dal punto di vista tecnico e può semplificare la possibile identificazione dei soggetti con ipercoagulabilità e quindi anche dei soggetti portatori di trombofilia ereditaria e/o acquisita.

Nell'uso comune si è soliti ricercare gli elevati livelli di d-dimero nei pazienti con elevata probabilità pre-test strumentale di trombosi venosa profonda, ma alcuni autori hanno anche evidenziato elevati livelli di d-dimero e/o di altri marcatori di ipercoagulabilità in soggetti portatori di trombofilia allo stato asintomatico.

Alcuni polimorfismi genetici, quali la mutazione Leiden del fattore coagulativo V e la mutazione A20210G della protrombina, esercitano già un ruolo preminente tra i polimorfismi genetici ricercati in caso di poliabortività (78,79,80). I polimorfismi genetici non ancora testati in studi clinici controllati includono il α -fibrinogeno, la mutazione 1299 del fattore V, la mutazione 34 val/leu del fattore coagulativo XIII e la mutazione 4G/5G del PAI-1 (74). Altre condizioni geneticamente correlate alla ipercoagulabilità, che possono essere associate a poliabortività, sono le carenze di inibitori fisiologici dell'emostasi quali proteina C, proteina S, antitrombina III (AT III) (81).

Le forme di trombofilia acquisite includono invece la presenza di una sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva o secondaria, elevati livelli circolanti di fattore coagulativo VIII, forme acquisite di carenza di proteina C coagulativa e proteina S (72,73), la carenza di attività, congenita o acquisita, di fattore coagulativo XII (82,83,84,85,86,87).

Dal punto di vista classificativo possiamo distinguere la sindrome da anticorpi antifosfolipidi in primitiva o secondaria, nel caso in cui sia associata a patologie disimmuni (patologie autoimmunitarie come LES o vasculiti o patologie neoplastiche). Le manifestazioni cliniche principali sono eventi trombotici arteriosi e/o venosi e patologia della gravidanza nelle donne, in particolare la poliabortività, associate ovviamente a presenza di anticorpi antifosfolipidi. Tra le diverse varietà di anticorpi antifosfolipidi sono più comunemente associate alla patologie della gravidanza gli anticorpi anticardiolipina (classi IgM e/o IgG) o lupus anticoagulant. Tuttavia anche altre categorie di anticorpi antifosfolipidi sono state identificate e diversamente associati alle patologie trombotiche come anticorpi antifosfatidilserina, antifosfatidilcolina, antifosfatidilinositolo, anti β 2-

glicoproteina I (β 2-GP I); inoltre diversi studi hanno segnalato la possibile presenza di anticorpi diretti contro epitopi presenti sui fattori della coagulazione determinando tra l'altro non solo alterazioni dei comuni test di screening coagulativi come PT INR e aPTT ma talvolta anche i dosaggi quantitativi dei fattori specifici. In tale campo Braulke e coll. hanno identificato per la prima volta un'associazione tra poliabortività e deficit acquisito di fattore XII (82), ma successivamente Jones e coll. hanno riscontrato in diversi studi l'associazione di anticorpi anti-fattore XII, sindrome da anticorpi antifosfolipidi e poliabortività (83,84,85).

Inoltre, nei disordini congeniti e/o acquisiti dell'emostasi va inclusa l'iperomocisteinemia (88,89) che può avere ugualmente cause congenite e/o acquisite. L'iperomocisteinemia, infatti, è stata associata, non solo a stati di ipercoagulabilità, ma anche a un'aumentata incidenza di trombosi venose e arteriose. Tra le cause acquisite di iperomocisteinemia riconosciamo una dieta povera di folati, condizioni patologiche (ipotiroidismo, alterazioni del ricambio idrosalino, ridotta attività fisica, condizioni iatrogene-farmacologiche); le condizioni congenite che si associano a iperomocisteinemia sono invece collegate alla presenza della forma termolabile dell'enzima MTHFR (metilentetraidrofolato reduttasi) sia nella variante C677T (già studiata in altre condizioni cliniche di trombofilia) che nel polimorfismo genetico della A₁₂₉₈C.

La difficile gestione della gravidanza nelle donne trombofiliche è negli ultimi anni oggetto di ricerche non solo epidemiologiche e laboratoristiche ma anche di tipo terapeutico. Non ci sono infatti consensi unanimi sulla gestione terapeutica della gravidanza delle donne trombofiliche, poiché la maggior parte degli studi disponibili in Letteratura è orientata nella prevenzione degli eventi tromboembolici della donna trombofilica in gravidanza e non verso la prevenzione della patologia della gravidanza stessa. L'utilizzo di farmaci anticoagulanti, quali le eparine a basso peso molecolare, per la prevenzione non solo degli eventi tromboembolici maggiori ma anche della patologia della gravidanza in donne trombofiliche è al

momento estremamente limitato ed un unico studio di tipo randomizzato controllato è attualmente disponibile in letteratura (90).

2. Sterilità femminile e alterazioni dell'emostasi.

Diverse sono le associazioni patologiche che comportano sterilità femminile, come precedentemente esposto, nel 5% dei casi tuttavia una chiara concausa patologica non è identificabile. Dati presenti in Letteratura sulla associazione tra sterilità femminile e ipercoagulabilità e/o trombofilia genetica/acquisita/combinata sono scarsi. Una nostra recente pubblicazione ha tuttavia sottolineato la possibile presenza di uno stato di ipercoagulabilità asintomatico presente anche in pazienti affette da sterilità femminile, legato nella maggior parte dei casi alla presenza di trombofilia molecolare per cause genetiche e/o acquisite e/o combinate (91).

Altri Autori in Letteratura hanno invece sottolineato una possibile associazione tra sterilità femminile e trombofilia per una maggiore incidenza delle varianti geniche del fattore V Leiden, della protrombina A20210G e della MTHFR C677T in pz con ripetuti insuccessi a tecniche di riproduzione assistita secondo ICSI\FIVET\IVF (92,93); tali aspetti sono tuttavia ancora da confermare su studi effettuati su vasta scala poiché i risultati presenti nelle pubblicazioni citate appaiono talvolta discordanti.

3. Scopo della ricerca.

Nel quadro delle problematiche inerenti le cause della poliabortività ricorrente e della sterilità femminile, obiettivo di questo lavoro è quello di ricercare il ruolo delle alterazioni congenite, acquisite e/o combinate dell'emostasi con tendenza alla trombofilia e degli stati di ipercoagulabilità nelle alterazioni dei processi riproduttivi. Un ulteriore approfondimento è inoltre rivolto all'associazione tra trattamenti ormonali e trombosi atipiche in donne giovani e al potenziale ruolo dei trattamenti antitrombotici nelle donne affette da abortività ripetuta e da sterilità idiopatica.

Parte 3 – Pazienti e metodi.

1. Selezione delle pazienti.

Sono state selezionate 99 pazienti di età inferiore ai 40 anni e body mass index (BMI kg/m²) < 26, afferenti all'ambulatorio di sterilità ed infertilità di coppia del Dipartimento Universitario di Scienze Ostetriche Ginecologiche e Medicina della Riproduzione dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" per

- Poliabortività, diagnosticata secondo i seguenti criteri:
 - ≥2 aborti nel I trimestre di gestazione
 - ≥2 aborti nel II trimestre di gestazione
 - almeno 1 morte endouterina fetale (MEF) nel III trimestre di gestazione

- Sterilità primaria

Sono state escluse pazienti affette da concomitanti patologie:

- Malformazioni uterine, fibromi intracavitari, idrosalpinge.
- Anovulazione, insufficienza della fase luteale.
- Patologie infettive genito-urinarie in atto (Chlamydia Trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma urealyticum, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis).
- Malattie del sistema endocrino in cattivo compenso metabolico nonostante terapia farmacologica (ipotiroidismo, diabete mellito tipo I e II).
- Iperprolattinemia.
- Anomalie cromosomiche.
- Patologie infiammatorie croniche di pertinenza immunopatologica (artrite reumatoide, LES, sclerosi sistemica, vasculiti ipocomplementemiche).

Tutte le pazienti in studio sono state sottoposte ai seguenti esami diagnostici:

- β -hCG per escludere una gravidanza in corso.
- Ecografia pelvica transaddominale e transvaginale.
- Isteroscopia diagnostica.
- Monitoraggio ecografico dell'ovulazione associato a dosaggio ormonale di estrogeni (durante il periodo periovulatorio) e di progesterone (nella fase medio luteale).
- Tampone vaginale e cervicale associato a diagnosi sierologica di infezione da Chlamydia Trachomatis.
- Dosaggio ormonale di TSH, FT₃, FT₄, anticorpi antitireoglobulina, antitireoperossidasi, Cariotipo da metafasi linfocitarie.
- Dosaggio di VES, PCR (proteina C reattiva), reumatest, anticorpi antinucleo (ANA), anticorpi antinucleo estraibile (ENA), C₃, C₄

Dopo una valutazione accurata del suddetto screening sono state incluse nello studio 60 pazienti di cui:

- ✓ 40 affette da abortività ripetuta
- ✓ 20 affette da sterilità di coppia primaria idiopatica

2. Metodi.

Allo scopo di identificare alterazioni dell'emostasi nelle 60 pazienti reclutate nello studio sono stati dosati i livelli ematici di:

- Omocisteina

e i livelli plasmatici di

- D-dimero, effettuato con metodica immunochimica [Enzygnost, Bhering, Scoppito (AQ), Italy]
- Proteina C
- Proteina S
- Antitrombina III (AT III)
- Anticorpi antifosfolipidi*
 - Anticorpi anticardiolipina IgM ed IgG*
 - La presenza dell'inibitore tipo Lupus anticoagulant*

*La diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolidi è stata effettuata in accordo ai criteri dell'American Rheumatology Association (94,95): presenza di almeno un criterio clinico e un criterio laboratoristico.

Criteri clinici:

- trombosi arteriose/venose di qualsiasi sede, organo o parenchima
- patologia della gravidanza (aborti ricorrenti nel II trimestre di gestazione, nascite premature prima della XXXIV settimana, tre o più aborti spontanei del I trimestre non altrimenti spiegabili con anomalie geniche e/o cromosomiche)

Criteri di laboratorio:

- anticorpi anticardiolipina IgG/IgM con livelli medio-elevati (> 30 UPL) riscontrati in due o più occasioni
- presenza del lupus anticoagulant (LAC) identificato secondo le linee guida dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (24):

- prolungamento dell'aPTT al caolino, in presenza del veleno di vipera Russell, alla diluizione della protrombina, al textarin time
- correzione dell'aPTT dopo aggiunta di fosfolipidi
- esclusione di altre coagulopatie (inibitore del fattore coagulativo VIII, presenza di aumentati livelli di glicoproteina ricca di istidina)
- mancata correzione dell'aPTT dopo aggiunta di miscela di plasma povero in piastrine

Tali dosaggi sono stati effettuati con le comuni tecniche dei laboratori di analisi

E' stata inoltre ricercata l'eventuale presenza di polimorfismi genetici condizionanti la trombofilia in collaborazione con il CEINGE S.c.a.r.l. Biotecnologie Avanzate con le seguenti procedure.

Un campione di sangue (5 mL) è stato ottenuto tramite prelievo venoso e immesso in una provetta contenente EDTA come anticoagulante. Il DNA è stato estratto usando enzimi di restrizione ("Nucleon BACC2" kit, Amersham, Germany). Le pazienti dei due gruppi sono state testate per i seguenti polimorfismi genetici utilizzando la metodica PCR (reazione polimerasica a catena) per l'amplificazione genica con specifici primers e l'apparecchio Light Cycler (Roche, Milan, Italy).

Polimorfismi genetici ricercati.

- Polimorfismo genetico C677T della MTHFR
- Polimorfismo genetico 1691 del fattore coagulativo V (fattore V Leiden, FVL)
- Polimorfismo genetico A20210G della protrombina (PTHRA20210G)

3. Gruppo controllo.

Nel gruppo controllo costituito da soggetti volontari comparabili per età, sesso, etnia e caratteristiche antropometriche sono state reclutate 30 pazienti. Tutti i soggetti selezionati presentavano anamnesi positiva per una o più gravidanze spontanee e condotte a termine senza complicazioni (i.e. insufficienza placentare, preeclampsia, gestosi EPH, ritardo di crescita intrauterino, abruptio placentae). Nei soggetti selezionati non era presente alcun rilievo anamnestico personale e/o familiare (parenti di I grado) di patologie trombotiche giovanili né del versante venoso (trombosi venosa profonda, trombosi venosa superficiale, tromboembolia polmonare) né di quello arterioso (stroke, sindromi coronariche acute, arteriopatia ostruttiva degli arti inferiori).

Sono state escluse inoltre dal gruppo controllo donne con anamnesi positiva per patologie ostetriche quali aborti del primo trimestre, morte intrauterina (MEF).

Allo scopo di identificare alterazioni dell'emostasi in tali soggetti sono state ricercate le cause di trombofilia geneticamente determinata indicate già per il gruppo di studio.

Parte 4 – Risultati.

1. P. Di Micco, **M D’Uva**, M. Romano, B. Di Micco, A. Niglio. Stroke due to left carotid thrombosis in moderate ovarian hyperstimulation syndrome. *Thromb Haemost* 2003; 90: 957-60 [Case Report]

Le associazioni tra terapie ormonali e trombosi arteriose e/o venose (i.e. contraccezione o terapia ormonale sostitutiva) sono ben note; pochissimi dati, peraltro non univoci, sono invece disponibili in Letteratura per le associazioni tra iperstimolazione ovarica controllata (COH) e/o sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) e eventi trombotici. Brevi serie di case reports sono disponibili per le trombosi venose anche di distretti atipici come il distretto venoso profondo degli arti superiori. Ancor più rara è l’associazione tra COH o OHSS con le patologie trombotiche arteriose in particolare lo stroke ischemico. Sono disponibili in Letteratura meno di 20 casi in cui tale associazione clinica si è verificata. Riportiamo la nostra esperienza clinica nella gestione di un caso di stroke ischemico a causa di una trombosi della carotide interna su arteria sana in una giovane donna sottoposta ad un protocollo di iperstimolazione ovarica controllata con conseguente OHSS moderata.