

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

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

Coordinatore: Prof. Claudio Pignata

Tesi di Dottorato

*"L'ecografia transvaginale nella donna infertile: dalla
valutazione pre-impianto alla nascita"*

**Tutore
Prof. Giuseppe De Placido**

**Candidato
Dott.ssa Paola Laviscio**

Anno Accademico 2007/2008

Indice

Abstract

pag. 4

Introduzione

pag. 6

L'ecografia transvaginale nello studio della cavità uterina pag.8

L'ecografia transvaginale nella medicina della
riproduzione pag.21

L'ecografia transvaginale nella predizione del parto
pretermine nelle gravidanze da ART pag.44

I linea di ricerca: l'ecografia transvaginale nella valutazione della cavità uterina nella donna infertile.

Scopo della ricerca pag.53

Risultati:

utero bicorni e utero setto. Diagnosi differenziale con
USG 2D e 3D Power Doppler pag. 54

“La patologia uterina benigna” pag. 56

II linea di ricerca: l'ecografia transvaginale nei cicli di riproduzione assistita. Miglioramento del tasso di impianto.

Scopo della ricerca pag. 57

Risultati:

Leptina e vascolarizzazione perifollicolare. Sue applicazioni nei cicli IVF. pag. 58

“ L’ecografia transvaginale e riproduzione assistita”. pag. 62

III linea di ricerca: l’ecografia transvaginale nella predizione del parto pretermine nelle gravidanze ottenute da tecniche di fecondazione assistita.

Scopo della ricerca pag.63

Risultati:

“Atosiban vs Ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at risk on basis of transvaginal ultrasound scan”. pag. 64

“Tecniche di riproduzione assistita e parto pretermine: FIVET ed ICSI a confronto. Nostra esperienza” pag. 65

“Progesterone micronizzato per via vaginale nella terapia di mantenimento delle gravidanze bigemine a rischio di parto pretermine. Nostra esperienza”. pag. 68

Discussione pag. 69

Bibliografia pag. 72

Abstract:

Transvaginal ultrasound for infertile woman: from pre-implantation evaluation to the birth.

Introduction

Transvaginal ultrasound (USG TV) plays a fundamental role in different applications in infertile women, from the study of uterine cavity to the evaluation of follicular and endometrial blood flow in IVF (in vitro fertilization) cycles. It's also commonly used to identify patients at high risk for spontaneous preterm birth. For all this capacity, transvaginal ultrasound represents an excellent and irreplaceable instrument for the study of infertile women.

Objective

The aim of this study was to evaluate the capacity of transvaginal ultrasound to improve pregnancy outcome in infertile women, from pre-implantation evaluation to the birth.

Study design

We conducted three lines of research:

First research line: "Transvaginal ultrasonography to evaluate uterine cavity in infertile woman". The capacity of transvaginal ultrasound as to study intracavity disease, was evaluated in this line. The role of power Doppler USG TV in differentiating septate and bicornuate uterus was investigated too.

Second research line: "Transvaginal ultrasonography in IVF cycles. Improvement of implantation rate". This research investigated the role of USG TV in IVF cycles and in particular the follicular vascularization and intrafollicular leptin levels in oocyte selection.

Third research line: "Transvaginal ultrasonography in the prediction of preterm delivery in ART (assisted reproductive technique) pregnancy", to identify the patients at the risk of preterm labour on the basis of the measure of cervical length that underwent to tocolytic treatment.

Results:

First research line: the results about intracavity diseases was published in "La patologia uterina benigna", in: Ecografia transvaginale, E.L.I. Medica editor, 2008. About the second endpoint, the 3D USG TV Power Doppler, with the identification of "gamma sign" seems to be the less invasive and the most sensitive, harmless and conclusive diagnostic tool to perform the differential diagnosis between septate and bicornuate uterus. The results haven't been published yet.

Second research line: the results about the application of USG TV in IVF cycles were published in "L'ecografia transvaginale e riproduzione assistita", in: Ecografia transvaginale, E.L.I. Medica editor, 2008. About the second endpoint significative correlations weren't found between perifollicular vascularization and intrafollicular levels. The results are poor and so they will not be published.

Third research line: the results were published in “Atosiban vs ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at risk on basis of transvaginal ultrasound scan”, J of Obstet and Gynecol, 2006; 26(5):396-401.

Conclusion:

Transvaginal ultrasound can improve fertility rate and pregnancy outcome in infertile women.

Key words: uterine malformation, perifollicular vascularization, preterm delivery.

INTRODUZIONE

L'utilizzo degli ultrasuoni nello studio degli organi pelvici ha mosso i suoi primi passi negli anni Cinquanta raggiungendo nel tempo progressivi e importanti successi.

Nel 1969 Ian Donald ottenne la migliore visualizzazione degli organi pelvici con la tecnica della vescica piena. Nel 1980 G. Cagnazzo descrisse una tecnica di scansione endovaginale per la valutazione della vescica e dell'uretra. Nel 1985 LW Popp pubblicò i risultati ottenuti con l'uso di una piccola sonda endovaginale applicata a modo di ditale sul dito esploratore.

L'introduzione nella pratica clinica delle moderne sonde endovaginali ad alta frequenza ha permesso di ottenere immagini di precisione e finezza sino ad allora impensabili.

Il miglioramento continuo delle tecniche Doppler, color e power, nonché l'introduzione dell'ecografia tridimensionale, hanno reso negli ultimi anni l'ecografia transvaginale uno strumento indispensabile nella diagnostica e nella ricerca di patologie ginecologiche di grande impatto clinico e sociale quali le neoplasie e la sterilità.

Nell'ambito del grosso capitolo rappresentato dall'infertilità di coppia l'ecografia transvaginale trova numerose applicazioni, dallo studio della cavità uterina per individuare patologie occupanti spazio o malformazioni, alla valutazione follicolare e endometriale, alla ecoguida nelle aspirazioni follicolari nelle tecniche di riproduzione assistita.

La gravidanza ottenuta da tecniche di fecondazione assistita è evento sempre più frequente. Basta pensare che circa il 15% delle coppie devono affrontare il problema della sterilità, primaria o secondaria. Le tecniche di fecondazione assistita, come l'iperstimolazione ovarica controllata e la fecondazione in vitro (IVF), aiutano molte coppie infertili a diventare genitori. In realtà, nonostante i grossi passi in avanti compiuti nel campo delle tecniche di fecondazione assistita, solo il 25% dei cicli IVF esita in una gravidanza.

Le più recenti ed interessanti applicazioni dell'ecografia transvaginale nell'ambito della riproduzione assistita sono tese proprio al miglioramento dell'outcome dei cicli stessi, dalla selezione ovocitaria per migliorare il tasso di impianto, alla predizione delle complicanze ostetriche, come il parto pretermine, delle gravidanze ottenute da tecniche di fecondazione.

L'ecografia transvaginale nella valutazione della cavità uterina nella donna infertile.

La patologia endometriale benigna ha un grosso impatto sociale essendo non solo una delle prime cause di sanguinamento anomalo sia in pre che in post-menopausa ma soprattutto una delle importanti concause di sterilità femminile.

La prevalenza delle lesioni benigne intracavitari è di circa il 35% in età fertile.

Nello studio della patologia cavitaria l'ecografia transvaginale ha sicuramente un ruolo principe.

Se l'isteroscopia con biopsia rappresenta infatti il gold standard per la valutazione della cavità uterina, l'ecografia transvaginale è sicuramente il metodo alternativo non invasivo più accurato comunemente utilizzato per lo studio dell'endometrio. Sono stati condotti diversi studi al fine di comparare l'accuratezza diagnostica dell'ecografia transvaginale, della sonoisterografia e della isteroscopia nella patologia cavitaria. Alcuni autori hanno ritenuto l'ecografia transvaginale una tecnica poco utile nella valutazione dello spessore endometriale nelle pazienti in premenopausa.

Secondo altri, invece, la potenzialità diagnostica dell'ecografia vaginale, eseguita da operatori esperti, è pari a quella dell'isteroscopia.

Nonostante la più bassa specificità e sensibilità che l'ecografia transvaginale abbia mostrato rispetto alla SIS o all'isteroscopia,

ribadiamo come questa sia la tecnica non invasiva con la maggiore accuratezza diagnostica nello studio della patologia cavitaria.

L'ecografia transvaginale fornisce una serie di informazioni sulle lesioni intracavitari: localizzazione e identificazione, tipizzazione ecostrutturale, valutazione della grandezza ed estensione, caratterizzazione istologica della lesione stessa.

I fibromiomi rappresentano i più frequenti tumori benigni uterini, essendo presenti nel 20% delle donne oltre i 30 anni e nel 40% delle donne oltre i 50 anni.

Possono essere di dimensioni variabili e sono per lo più multipli. Nel 95% dei casi interessano il corpo dell'utero, nel 3.5% il collo, nell'1.5% l'istmo. I fibromiomi sottomucosi sono caratterizzati da uno sviluppo in parte intramurale, in prossimità dell'endometrio, improntando e deformando quindi la cavità uterina. Come i sottosierosi, possono essere peduncolati, protundendo completamente nella cavità e delineando il quadro del mioma intracavitario.

Alcuni miomi, soprattutto se di grandi dimensioni, possono andare incontro a fenomeni di degenerazione cistica. Con l'età avanzata possono insorgere fenomeni di atrofia con aree di sclerosi e parziali o totali calcificazioni.

Agli ultrasuoni il mioma appare come una formazione rotondeggiante, nettamente delimitata dai tessuti circostanti con ecogenicità variabile da ipo a iperecogena. Per lo studio ecografico del mioma è utile un alto guadagno.

Nei fibromiomi con marcata degenerazione la transonicità è simile a quella delle neoformazioni cistiche mentre la presenza di calcificazioni determina echi iperecogeni con cono d'ombra acustico posteriore.

Il mioma sottomucoso si presenta come una formazione solida, rotondeggiante, con una ecogenicità simile al miometrio, più o meno omogeneo, in continuità con il miometrio stesso ma protrudente nella cavità endometriale, interrompendo l'interfaccia miometrio-endometrio.

I miomi sottomucosi sono classificati secondo l' "European Society of Gynecologic Endoscopy" in: tipo 0 (mioma sottomucoso peduncolato senza estensione intramurale); tipo I (mioma sessile con una componente intramurale inferiore al 50%), tipo II (mioma con una componente intramurale superiore al 50%).

Nella diagnosi differenziale dei fibromiomi, soprattutto quando di piccole dimensioni, rientrano i polipi endometriali, le raccolte di muco o i coaguli intracavitari. La vascolarizzazione studiata con power Doppler mostra, meglio se con l'ausilio della sonoisterografia, il pattern tipico del mioma sottomucoso con più vasi originanti dal miometrio stesso.

Le iperplasie e i polipi uterini, sono legati ad un'anomala proliferazione endometriale. Uno stimolo estrogenico prolungato sull'endometrio, anche se di modesta entità, non adeguatamente bilanciato dal progesterone, può determinare lo sviluppo di iperplasia endometriale o di poliposi endometriale. Condizioni di questo tipo si verificano spesso nelle pazienti infertili affette da policistosi ovarica.

Le iperplasie endometriali possono essere classificate in: iperplasia ghiandolare cistica, iperplasia semplice, con o senza atipie, iperplasia complessa, con o senza atipie. Le iperplasia semplice e complessa sono il risultato di una stimolazione estrogenica presente non bilanciata dal progesterone.

All'USG transvaginale l'endometrio appare ispessito in maniera uniforme e marcatamente iperecogeno rispetto al miometrio circostante. L'iperplasia ghiandolare cistica, tipo "swiss cheese", è il frutto di una pregressa stimolazione estrogenica, poi cessata, che ha indotto una dilatazione ghiandolare su endometrio in via di atrofia. All'ecografia transvaginale sono visibili, all'interno dello spessore endometriale, piccole formazioni rotondeggianti anecogene riferibili ad accumuli di muco nelle ghiandole iperplastiche.

La diagnosi differenziale tra i tipi istologici di iperplasia non è comunque possibile ecograficamente.

Alcazar, 2003 ha riportato un pattern vascolare identificativo di iperplasia caratterizzato da vasi sparsi (scattering) all'interno dell'endometrio.

I polipi endometriali sono neoformazioni, uniche o multiple, spesso causa di sanguinamenti anomali. Possono interessare ogni fascia d'età; nella maggior parte dei casi si sviluppano tra i 30 e 60 anni e sono patologie comuni durante la menopausa. Nelle donne in età riproduttiva anche piccoli polipi possono ridurre la fertilità ed aumentare il rischio di aborto.

Sebbene rappresentino un'entità prevalentemente benigna, nel 2-3 % dei polipi endometriali è stata riscontrata la presenza di carcinoma.

Shushan, 2004, riporta una incidenza di malignità su polipo endometriale di 1.5%, sottolineando l'importanza di rimuovere anche i polipi asintomatici.

Sotto l'influenza ormonale l'allungamento delle ghiandole endometriali, il tessuto stromale e le arterie spirali danno al polipo il suo caratteristico aspetto. La congestione stromale conduce ad una stasi venosa causando necrosi apicale e sanguinamento. Tuttavia, per la lentezza con cui questo processo avviene, molti polipi restano asintomatici e per lungo tempo non diagnosticati e spesso la loro individuazione è del tutto occasionale.

Ecograficamente i polipi endometriali si presentano come masse iperecoiche omogenee, a margini netti, di grandezza variabile, con o senza spazi cistici, che alterano la linea mediana endocavitaria, senza interruzione dell'interfaccia miometrio-endometrio.

I polipi endometriali possono essere sessili o peduncolati. Per l'identificazione dei polipi l'ecografia dovrebbe essere eseguita in fase proliferativa iniziale. In fase luteale, infatti, l'endometrio, di tipo secretivo, presenta la stessa ecogenicità dei polipi.

I polipi possiedono un peduncolo vascolare, cosiddetto *feeding vessel*, originante dall'arteria uterina. L'ecografia, con l'utilizzo della tecnica color o power Doppler, permette l'individuazione di questo peduncolo vascolare, rappresentato o da un singolo vaso o da più rami arteriosi, centrali, originanti da una singola arteria spirale subendometriale.

Il power Doppler è la tecnica meglio indicata per lo studio di questo tipo di vascolarizzazioni in quanto è in grado di rivelare flussi a velocità molto bassa e con direzione perpendicolare all'angolo di

insonazione. Il suo utilizzo ha notevolmente migliorato la sensibilità diagnostica dell'ecografia nell'identificazione dei polipi.

Timmermann, 2003, ha sottolineato come l'utilizzo del power Doppler incrementi il valore predittivo positivo dell'USG TV portandolo a 81.3% per i polipi endometriali e al 94,2% per le altre patologie intracavitarie. Jakab, 2004, ha riportato una detection rate per il feeding vessels di 0.97 nelle pazienti asintomatiche e di 0.91 nelle pazienti sintomatiche.

Il rilievo dei caratteristici pattern di vascolarizzazione delle lesioni intracavitarie, senza o con sonoisterografia, risulta in un alto detection rate delle lesioni endometriali focali, con l'effettiva possibilità di distinzione tra polipi e fibromi.

Alcuni autori hanno sottolineato come dallo spettro Doppler del feeding vessels fosse possibile sospettare un' atipia indicando nel flusso a bassa resistenza un'alta predittività per polipo atipico.

La sindrome di Asherman è definita come la presenza di sinechie permanenti intrauterine oblitteranti parzialmente o completamente la cavità uterina. La più comune causa è la dilatazione e curettage in caso di aborto, con una incidenza riportata del 14 e 32% rispettivamente dopo 2 e 3 D&C con più del 50% di adesioni severe. Le donne infertili vengono spesso sottoposte a revisioni cavitari multiple per abortività ripetuta. Da qui la necessità di prendere in considerazione questo tipo di ostacolo meccanico all'impianto, seppur di bassa incidenza.

La sintomatologia clinica include alterazioni mestruali come ipo- o amenorrea, infertilità, abortività ripetuta. Anche se alcuni autori

hanno attribuito all'ecografia transvaginale una sensibilità del 91% e una specificità del 100% nella identificazione di sinechie intrauterine, tale patologia è di difficile diagnosi ecografica. L'approccio isteroscopico ha apportato, invece, un rapido miglioramento nella diagnosi e nel trattamento delle obliterazioni parziali e totali.

Ecograficamente nella sindrome di Asherman è possibile il rilievo di piccole aree fortemente iperecogene all'interno dell'endometrio, con possibili formazioni transoniche intracavitarie dovute all'accumulo di fluido. La mucosa endometriale può essere completamente assente o presente in aree irregolari di tessuto. La normale rima endometriale, pertanto, può presentarsi come una linea iperecogena più o meno regolare.

L'ecografia tridimensionale ha apportato un significativo contributo allo studio della patologia endometriale benigna.

Il piano coronale permette una visualizzazione più accurata e immediata delle lesioni intracavitarie, consentendo di valutarne il numero, la localizzazione e la base di impianto.

Tra le applicazioni dell'ecografia tridimensionale sono di notevole ausilio alla diagnosi della patologia cavitaria sia l'applicazione "oblique" che la tecnica *multislice*. L'*oblique* consente, partendo da un piano, attraverso la determinazione di una finestra arbitraria, di ottenere un diverso piano di scansione contemporaneamente a quello di base; la tecnica "multislice" permette di rappresentare il volume acquisito con fette di scansione sequenziali ogni 4 mm.

Nell'iperplasia endometriale lo studio del volume dell'endometrio con tecnica 3D rispetto alla convenzionale ecografia bidimensionale, si è mostrato maggiormente accurato.

Il volume endometriale calcolato con tecnica VOCAL (Virtual Organ Computer Aided Analysis) è altamente riproducibile, soprattutto utilizzando piccoli angoli di rotazione. Alcuni autori raccomandano un angolo di 9°. La tecnica VOCAL permette la misurazione del volume endometriale mediante rotazione sui piani longitudinale, trasverso e coronale. Il piano coronale è usualmente proposto per la misurazione del volume endometriale, sebbene su modelli in vitro non siano state apprezzate differenze tra il piano coronale e il trasverso.

La 3D Power Doppler angiografia (3D-PDA) permette la quantificazione del flusso ematico totale dell'organo mediante l'analisi del segnale power Doppler, integrando automaticamente tre tipi di indici. L'indice di vascolarizzazione (VI) misura il numero di voxel colore in un volume. È espresso in percentuale e quantifica la densità vascolare. L'indice di flusso (FI) corrisponde al valore medio del colore in un voxel colore; indica l'intensità media del flusso di sangue ed è espressa da un numero intero da 1 a 100. L'indice di vascolarizzazione-flusso (VFI) è il valore medio del colore in tutti i voxel nel volume; esso rappresenta pertanto sia la vascolarizzazione che il flusso, indicando la perfusione del tessuto. Anche questo parametro è espresso da un numero intero tra 0 e 100. Questi indici si sono mostrati abbastanza riproducibili nella valutazione del flusso endometriale e subendometriale.

L'indice di flusso si è mostrato più sensibile nella diagnosi di iperplasia endometriale che di carcinoma.

Nell'ambito della patologia uterina le malformazioni mulleriane rappresentano una causa importante, ma quasi sempre trattabile di infertilità.

Dopo la sesta settimana di sviluppo embrionario, i due condotti paramesonefrici si fondono per formare il canale uterino, che include l'utero ed i quattro quinti cefalici della vagina. Inizialmente separati da un setto, alla nona settimana i dotti paramesonefrici si fondono a partire dal margine caudale, formando un unico canale utero-vaginale. La regressione del setto è il risultato dell'apoptosi mediata dal gene BC12. L'assenza di tale gene, o la sua mancata espressione, causerebbero un'alterazione di tale processo. Alla dodicesima settimana l'utero normoconformato assume la sua caratteristica configurazione. La duplicazione dell'utero risulta, invece dalla mancata fusione dei dotti paramesonefrici che può essere localizzata o riguardare tutta l'estensione degli stessi, configurando quadri variabili dall'utero arcuato all'utero didelfo. L'utero setto e l'utero bicorni rappresentano comunque le forme più frequenti di anomalie mulleriane.

Le malformazioni uterine possono essere diversamente classificate.

In base all'eziopatogenesi, come riportato dall'American Fertility Society nel 1998, distinguiamo:

- agenesia, utero unicorno senza corno rudimentario, per mancato sviluppo di uno o più dotti di Muller.

- utero unicorne con corno rudimentario senza propria cavità, per fallimento nella canalizzazione dei dotti.
- utero didelfo, utero bicorne, per mancata o anomala fusione dei dotti mulleriani.
- utero setto, utero arcuato, per mancato riassorbimento del setto uterino mediano.

Tutte queste malformazioni giocano un ruolo di primo piano nell'ambito dell'infertilità, ostacolando o addirittura impedendo la fecondazione e l'eventuale impianto dell'embrione, con un'incidenza nella donna infertile che oscilla dal 5 al 10%. L'utero setto nelle sue varie forme rappresenta la patologia con maggiore frequenza, (42, 1%) con un'incidenza nella popolazione generale di circa il 2% e del 9-30% nelle pazienti affette da abortività ripetuta. L'utero setto influenza negativamente il decorso della gravidanza attraverso tre meccanismi: la riduzione del volume della cavità uterina, l'insufficienza cervico-istmica e l'insufficiente apporto vascolare nella sede dell'impianto.

Fedele ha dimostrato, attraverso studi di microscopia elettronica, che la presenza del setto ostacola l'annidamento e lo sviluppo di una gestazione a causa della sua notevole componente fibroelastica che impedisce all'endometrio che riveste il setto di raggiungere una maturità adeguata a favorire lo sviluppo della blastocisti. Le pazienti infertili con anomalie mulleriane annoverano, oltre all'abortività ripetuta del primo trimestre, una serie di patologie che vanno dal ritardo di crescita intrauterino, al parto pretermine, alle presentazioni anomale, e, non ultima, alla ritenzione placentare.

La valutazione della cavità uterina assume, quindi, un ruolo di fondamentale importanza nello studio della coppia infertile.

Di pari passo con i progressi della chirurgia endoscopica, le recenti acquisizioni in termini di imaging ecografico transvaginale tridimensionale sembrano aprire nuovi sviluppi nello studio di tali patologie.

Le tecniche diagnostiche con cui è possibile indagare la morfologia uterina sono molteplici, dall'ecografia alla risonanza magnetica.

L'isterosalpingografia è stata considerata per anni l'esame diagnostico di prima scelta, tuttavia numerosi studi presenti in letteratura hanno dimostrato i limiti di tale tecnica che non permette una diagnosi differenziale tra utero setto e bicorni. Le tecniche ecografiche a disposizione per lo studio della patologia malformativa uterina sono: l'ecografia 2D transaddominale (TA) e transvaginale (TV), l'ecografia 3D, TA e TV, il Color e Power Doppler, 2D e 3D per via transvaginale, la sonoisterografia (SIS).

Kupesic nel 2001 ha paragonato l'ecografia TV, TV CD, SIS e 3D TV, attribuendo alla SIS e alla USG 3D specificità e valore predittivo positivo del 100% nella diagnostica della patologia malformativa uterina. Sylvestre nel 2003 ha assegnato alla SIS 2D e 3D sensibilità del 98% e specificità del 100%.

Tuttavia rimane il problema della diagnosi differenziale tra l'utero setto e l'utero bicorni.

Nell'utero bicorni ogni corno ha la propria cavità, col proprio endometrio, miometrio e sierosa; nell'utero setto, invece, c'è una fusione delle due componenti miometriali e un regolare, o quasi,

profilo del fondo. L'importanza della diagnosi differenziale delle malformazioni uterine è legata alla possibilità di trattare le pazienti con utero setto affette da infertilità con intervento di metroplastica per via isteroscopica, incidendo in maniera significativa sulla diminuzione della percentuale di aborti spontanei e parti pre-termine e aumentando il pregnancy rate.

L'identificazione di questi difetti dipende dalla capacità delle tecniche di imaging di visualizzare in maniera adeguata la superficie del fondo dell'utero.

Secondo Pellerito, la diagnosi differenziale tra utero setto e utero bicorni è formulabile in base alla profondità della depressione uterina presente sul fondo uterino che, se superiore ad 1 cm, deporrebbe per l'utero bicorni, se inferiore ad un 1 cm, deporrebbe per l'utero setto. In tal caso una scansione a vescica piena potrebbe essere d'aiuto. Parimenti la diagnosi differenziale tra utero arcuato e utero subsetto potrebbe essere formulabile in base all'ampiezza dell'angolo della struttura intracavitaria che, se acuto, deporrebbe per l'utero subsetto, oppure, se ottuso, deporrebbe per l'utero arcuato.

Diversi studi hanno dimostrato che l'ecografia transvaginale tridimensionale è in grado di migliorare la sensibilità dell'ecografia.

Già nel 1997 Wu et al. attraverso uno studio prospettico condotto su 40 pazienti con anamnesi di aborti ripetuti e infertilità, ha affermato che con l'USG 3D l'utero setto e il bicorni potevano essere diagnosticati correttamente nel 92% e nel 100% dei casi rispettivamente, utilizzando l'isteroscopia e/o la laparoscopia come conferma diagnostica.

Alborzi, nel 2002, ha proposto una diagnosi differenziale tra utero setto e utero bicorni mediante infusione di liquido libero in peritoneo tramite SIS per definire il contorno uterino.

La possibilità di rappresentazione del piano coronale è la vera grande rivoluzione ecografica dell'ecografia tridimensionale. Poter osservare un utero malformato sul piano coronale aiuta nella comprensione della condizione, nel paragone delle due emicavit , nel rapporto tra queste e la regione cervicale.

Tuttavia resta ancora controversa, nella pratica clinica, la diagnosi ecografica differenziale tra utero setto e utero bicorni nei casi in cui resta non valutabile il fondo uterino.

Un ambito finora inesplorato   stato la differenza in termini di vascolarizzazione tra utero setto e utero bicorni. In questo campo dal 2004 si   mossa la nostra esperienza. In uno studio preliminare condotto su 10 pazienti con utero bipartito, l'ecografia transvaginale 2D mostrava al Power Doppler in sei pazienti un particolare tipo di vascolarizzazione intercavitaria con singolo vaso mediano, mimante la lettera greca gamma. In queste sei pazienti la laparoscopia ha diagnosticato un utero bicorni. Nelle altre quattro pazienti la vascolarizzazione mediana intercavitaria appariva disarrangiata; la laparoscopia e l'isteroscopia hanno confermato un utero setto. Il segno denominato *gamma sign*, derivante dalla fusione di due rami delle arterie uterine,   stato pertanto ritenuto probante di utero bicorni. Dal 2004 ad oggi   continuata questa ricerca al fine di convalidare il segno ecografico capace di diagnosi differenziale tra utero setto e bicorni.

L'ecografia transvaginale nella medicina della riproduzione.

Nella medicina della riproduzione l'ecografia transvaginale svolge un ruolo di primo piano. Le sue principali applicazioni riguardano la valutazione degli organi pelvici, la valutazione del ciclo ovarico ed endometriale, il monitoraggio dello sviluppo follicolare sia in cicli spontanei che indotti, l'agoaspirazione follicolare e il transfer ecoguidato intrauterino degli embrioni per via transcervicale.

La valutazione ecografica iniziale di una paziente sterile viene effettuata durante la fase follicolare del ciclo, al fine di identificare eventuali fattori uterini, ovarici, meccanici o cervicali di sterilità.

Il fattore uterino è responsabile nel 9,5% dei casi di sterilità. Attraverso l'esame ecografico è possibile identificare la presenza di malformazioni uterine, patologie miometriali e/o endometriali.

Il fattore ovarico è coinvolto nel 10-20% dei casi; l'esame ecografico consente di individuare alterazioni della normale funzionalità ovarica (anovulazione, insufficienza della fase luteale, sindrome del follicolo luteinizzato non rotto), cisti ovariche o paraovariche, endometriosi ovarica, ovaie multifollicolari e micropolicistosi ovarica.

Il fattore tubarico è responsabile del 20% dei casi di sterilità. In condizioni fisiologiche non è possibile evidenziare ecograficamente le tube; solo la presenza di patologie in cui si ha raccolta di liquido al suo interno o in cavità peritoneale, quali la salpingite acuta o cronica o una gravidanza extrauterina permettono la loro visualizzazione. Lo studio della pervietà tubarica è possibile invece con la sonoisterosalpingografia, tecnica altamente sensibile che associa alla

tradizionale ecografia transvaginale l'introduzione di una soluzione salina in cavità uterina per via transcervicale.

L'esame ultrasonografico del canale cervicale permette di valutare la presenza di formazioni che possono impedirne la pervietà. La valutazione ecografica della lunghezza cervicale riveste un ruolo di primo piano nella diagnosi di incompetenza cervico-istmica o di minaccia di parto pre-termine nelle gravidanze ottenute da tecniche, argomento che verrà successivamente trattato nella III linea di ricerca. La valutazione dell'ovaio e dell'endometrio è fondamentale nello studio delle pazienti sterili prima di iniziare un programma di procreazione medicalmente assistita.

Nella valutazione e monitoraggio ovarico ed endometriale in cicli spontanei, l'ecografia ovarica ha lo scopo di studiare lo sviluppo follicolare, l'ovulazione, la formazione del corpo luteo.

Il monitoraggio ecografico dell'ovulazione inizia nei cicli spontanei al 6-7° giorno del ciclo durante la fase follicolare precoce in cui si possono distinguere un numero variabile di follicoli antrali di 3-5 mm. Dall'8-9° giorno inizia la selezione del follicolo dominante che a tale stadio misura circa 10 mm. Le dimensioni follicolari sono calcolate effettuando la media dei due diametri massimi. La crescita del follicolo aumenta di circa 1,5-2 mm al giorno fino ad arrivare ad un diametro periovulatorio di circa 21-22 mm, con una variabilità individuale che va da 17 a 27 mm. L'ovulazione, quindi, può avere una cadenza variabile per cui dal momento in cui si individua un follicolo di 15-16 mm, il controllo deve divenire quotidiano.

Avvenuta l'ovulazione le pareti follicolari diventano irregolari ed entro 24-48 ore è possibile osservare il corpo luteo. Altro segno dell'avvenuta ovulazione è la comparsa di una falda liquida nel cavo del Douglas che è massima il 4-5° giorno dopo l'ovulazione.

Al color-power Doppler è possibile studiare la vascolarizzazione perifollicolare che appare più marcata attorno al follicolo dominante. Il Doppler pulsato mostra alta impedenza e bassa velocità all'interno di questi vasi.

E' possibile con il color Doppler anche lo studio del flusso ematico delle arterie ovariche durante le varie fasi del ciclo. Le resistenze ovariche sono valutate quando il follicolo è di circa 15 mm, appaiono alte all'inizio della fase follicolare, si riducono progressivamente raggiungendo un minimo nella fase luteale tardiva.

Vari lavori dimostrano che vi sono differenti caratteristiche del flusso ematico intraovarico tra l'ovaio contenente il follicolo dominante, in cui le onde flussimetriche presentano bassi indici di resistenza, ed il controlarterale, in cui il flusso è a maggiore resistenza. Poco prima dello scoppio follicolare si ha aumento della vascolarizzazione e riduzione delle resistenze; tale flusso è presente anche attorno al corpo luteo (ring of fire).

E' possibile studiare il volume e la vascolarizzazione di entrambe le ovaie, del follicolo dominante e del corpo luteo anche attraverso l'ecografia tridimensionale (USG 3D).

Il volume dell'ovaio dominante e del follicolo dominante aumentano durante la fase follicolare diminuendo dopo lo scoppio del follicolo per poi aumentare nuovamente. Gli indici di vascolarizzazione

dell'ovaio dominante, del follicolo dominante e del corpo luteo, valutati con il 3D power Doppler, aumentano durante la fase follicolare restando alti anche dopo la rottura del follicolo e la formazione del corpo luteo. Ciò è dovuto alla formazione di nuovi vasi e all'aumento di fattori angiogenetici. Il volume e gli indici di vascolarizzazione dell'ovaio controlaterale non presentano queste modifiche durante il ciclo.

La struttura ecografica dell'endometrio è il riflesso diretto della secrezione ormonale ovarica, per cui è importante determinare la sincronia fra sviluppo follicolare e maturazione dell'endometrio. Con approccio transvaginale è possibile una valutazione qualitativa dell'endometrio associato alla misurazione del suo spessore. In fase mestruale l'endometrio appare lineare ed iperecogeno, durante la fase proliferativa diventa iposonico e si ispessisce misurando al 7-8° giorno circa 5-7mm; raggiunge uno spessore di circa 8-12mm in fase periovulatoria con aspetto ecografico a "tre linee". Dopo l'ovulazione diventa omogeneamente iperecogeno e aumenta di spessore per poi ridursi nella fase luteale tardiva fino alla mestruazione.

Il color Doppler viene utilizzato anche per lo studio delle caratteristiche del flusso ematico delle arterie uterine durante il ciclo mestruale. Tale flusso è massimo in fase emiluteale; dalla fase follicolare al giorno prima dell'ovulazione si assiste ad una riduzione degli indici di resistenza che raggiungono i livelli più bassi al 18° giorno per poi restare immutato per il resto del ciclo.

Quando non si ottengono gravidanze in cicli spontanei, si ricorre all'induzione farmacologica della crescita follicolare multipla.

Il monitoraggio ecografico ha, in tali casi, lo scopo di seguire l'evoluzione dei follicoli e dell'endometrio per stabilire il momento più adatto per avere rapporti o, nel caso in cui sia parte di un programma di fecondazione assistita, per determinare il dosaggio giornaliero delle gonadotropine esogene ed il giorno utile per la somministrazione dell'hCG. Un corretto monitoraggio è indispensabile non solo al fine di ottenere una gravidanza, ma anche per evitare i due principali rischi legati all'induzione, ossia, le gravidanze multifetali e la sindrome da iperstimolazione ovarica.

Nei cicli di procreazione assistita a bassa tecnologia, che non prevedono un prelievo di ovociti, lo scopo del monitoraggio è l'adeguamento della terapia in base alla risposta ovarica o la sospensione del ciclo in caso di risposta ovarica inadeguata o eccessiva (più di 3-4 follicoli con diametro medio maggiore di 16 mm), ed il timing della somministrazione dell'hCG per indurre l'ovulazione.

Nei programmi di fecondazione ad alta tecnologia, che prevedono il prelievo ovocitario, il monitoraggio è ecografico ed endocrino, attraverso la valutazione dei livelli di 17 beta estradiolo. Le pazienti sono sottoposte a desensibilizzazione con analogo del GnRH al 3° giorno del ciclo, le ovaie diventano prive di follicoli e l'endometrio appare lineare. Lo sviluppo follicolare viene monitorato dal 6-8° giorno del ciclo dall'inizio della stimolazione individuando il momento più idoneo alla somministrazione dell'hCG quando almeno 2-3 follicoli raggiungono i 16-18 mm di diametro e i livelli di 17-beta-estradiolo sono di 200-300 pg/ml per follicolo maturo. E' necessario

calcolare il diametro medio di tutti i follicoli, che può risultare difficoltoso data la loro molteplicità e compressione reciproca.

E' stata dimostrata che la più alta percentuale di recupero ovocitario si ottiene da follicoli con diametro medio di 18-20 mm. Tale misura può essere indaginosa quando la forma follicolare è distorta per la compressione da parte dei follicoli adiacenti.

Tale problema potrebbe essere superato con l'utilizzo dell'ecografia 3D. Vari autori hanno dimostrato che il calcolo del volume follicolare effettuato con tecnica tridimensionale è più affidabile nell'identificazione dei follicoli con volume di 3-7ml, considerato il gold-standard al momento del pick-up. Vari studi in letteratura hanno correlato il volume ovarico determinato con tecnica 3D e la conta dei follicoli antrali con la risposta ovarica alla stimolazione farmacologica; ovaie di piccole dimensioni e un ridotto numero di follicoli antrali sono associati a scarsa risposta all'hCG e ad un'alta percentuale di sospensione del ciclo.

Mercè nel 2006 ha correlato il volume ovarico, il volume follicolare ed il numero dei follicoli con l'outcome delle tecniche di fertilizzazione FIVET e ICSI, evidenziando una diretta correlazione fra questi parametri ed il numero di ovociti fertilizzati, il numero e la qualità embrionale al giorno del transfer.

Il volume ovarico era calcolato in passato applicando la formula dell'ellissoide sopra o sottostimando il volume reale dell'organo. Il calcolo del volume con tecnica 3D effettuato off-line sul contorno dell'ovaio in scansioni seriate è indubbiamente più affidabile e con diminuzione del discomfort della paziente.

L'ecografia transvaginale rappresenta un valido ausilio per il prelievo ovocitario nei programmi di fecondazione in vitro. Il pick-up per via vaginale offre numerosi vantaggi rispetto alle vie laparoscopica e transaddominale precedentemente utilizzate.

L'utilizzo di un trasduttore vaginale e ad elevata frequenza migliora la qualità delle immagini ultrasonografiche consentendo l'aspirazione anche di follicoli di piccole dimensioni; si riduce la distanza fra ovaio e sonda eliminando le difficoltà che presentava l'approccio transaddominale legate alla posizione delle ovaie o allo spessore dello strato adiposo della parete addominale. Permette una buona identificazione dei vasi pelvici e delle anse intestinali riducendo i rischi legati all'intervento; viene eliminata la necessità di effettuare un'anestesia generale riducendo le possibili complicanze legate a tale procedura e i tempi dell'intervento.

Di fondamentale rilevanza appaiono i risultati ottenuti in termini di percentuale di recupero ovocitario rispetto alle tecniche utilizzate in passato.

La procedura viene effettuata con la paziente in posizione litotomica; dopo disinfezione della vagina si introduce la sonda ricoperta da cappuccio sterile ed armata di guida montata entro cui scorre l'ago a sua volta collegato ad un sistema di aspirazione.

Le ovaie vengono punte attraverso i fornici vaginali laterali; dopo averle identificate sullo schermo ecografico si allinea la sonda al diametro massimo del follicolo più vicino alla parete vaginale, solo a questo punto si spinge l'ago al suo interno e se ne aspira il contenuto. La punta dell'ago deve essere sempre visualizzata sullo schermo

ecografico al fine di evitare la puntura di organi adiacenti all'ovaio stesso. Ecograficamente è possibile osservare il progressivo collabimento del follicolo aspirato; conclusasi l'aspirazione di un follicolo si orienta la sonda in modo da inquadrare un follicolo contiguo e lo si aspira. Si continua così l'aspirazione di tutti i follicoli presenti procedendo dal polo inferiore a quello superiore dell'ovaio, in modo da effettuare il recupero ovocitario con una sola puntura dell'organo, riducendo sia i traumatismi alla gonade sia il rischio di infezioni endopelviche. Dopo aver concluso l'aspirazione di tutti i follicoli di un ovaio si estrae l'ago dalla cavità pelvica e si passa all'ovaio controlaterale. E' opportuno a termine della procedura controllare ecograficamente gli organi pelvici per escludere eventuali sanguinamenti dai siti di puntura.

Dopo 48-72 ore dal prelievo ovocitario, gli embrioni vengono trasferiti in utero. Il trasferimento intratubarico dei gameti e degli embrioni nella tuba per via laparoscopica o isteroscopica, o per via transcervicale ecoguidata non migliora i risultati in termini di tasso d'impianto, per cui il transfer in utero degli embrioni per via transcervicale rimane ancora oggi la tecnica più utilizzata. La possibilità di facilitare il transfer embrionario grazie all'ausilio di una sonda transaddominale è stata per prima riportata da Strickler nel 1985. Molti studi effettuati successivamente con l'impiego prima della sonda transaddominale, più recentemente della sonda transvaginale per una migliore risoluzione, hanno confermato come il transfer ecoguidato comparato con il transfer alla cieca ("blind" transfer) aumenti il tasso di impianto e di gravidanza.

Tale tecnica consente di visualizzare con esattezza il decorso del catetere con cui si trasferiscono gli embrioni in cavità uterina, in modo da posizionare gli stessi a circa 1-1.5 cm dal fondo, riducendo i casi di impianto anomalo.

Inoltre, l'atraumaticità dell'operazione evita microtraumi a carico della mucosa endometriale causa di microcontrazioni uterine che interferirebbero con l'adesione ed il successivo impianto embrionale.

Nel 2005 è stato pubblicato uno studio preliminare che mette a confronto l'ecografia bidimensionale con l'ecografia tridimensionale impiegate durante il transfer embrionario, per la valutazione del corretto posizionamento del catetere; i risultati dimostrano come l'ecografia 3D abbia una sensibilità maggiore, per cui potrebbe in futuro essere impiegata nel guidare il transfer al fine di ottenere un impatto positivo sui tassi di gravidanza.

Le applicazioni dell'ecografia transvaginale nei cicli di riproduzione assistita sono studiate anche allo scopo di migliorare i tassi di impianto.

La qualità embrionaria e la recettività endometriale rappresentano due tra i fattori ritenuti determinanti il successo di una tecnica di riproduzione assistita.

Da anni gruppi di ricerca internazionale concentrano i propri sforzi nell'identificazione di marcatori specifici atti a migliorare il tasso di impianto.

Già Gregory nel 1998, riportando i dati dell'United Kingdom secondo i quali circa il 90% degli embrioni selezionati per il transfer fallisce

l'impianto, sottolineava la necessità impellente di identificare fattori favorevoli l'impianto.

La legge italiana 40/2004, che regola l'esecuzione di tecniche di fecondazione assistita (IVF), ha apportato notevoli limitazioni indicando in tre il numero massimo degli ovociti da fecondare, obbligando al trasferimento contemporaneo di tutti gli embrioni ottenuti e proibendo la crioconservazione degli embrioni.

Dati del Ministero Nazionale della Sanità hanno sottolineato come nel 2003 da 19.000 coppie sterili si siano avute 5.000 nascite, mentre nel 2004, da 21.000 coppie sterili siano nati 3.700 bambini. La differenza è stata imputata alle gravidanze ottenute dal trasferimento di embrioni congelati.

Un recente studio multicentrico (Ragni, 2005) ha valutato l'impatto delle limitazioni imposte dalla nuova legge sul *pregnancy rate*, indicando come non significativa la differenza nel tasso di gravidanze ottenute prima e dopo la legge 2004. I risultati, seppur incoraggianti, sono alterati da diversi *biases* a causa del disegno retrospettivo dello studio e comunque non definitivi né univoci.

È pertanto sicuramente aumentata la necessità di ottimizzare l'outcome dei cicli di IVF.

Se prima del 2004 la selezione era effettuata principalmente sugli embrioni (De Placido, Hum Reprod 2002), l'attenzione è ora concentrata sulla selezione ovocitaria, al fine di scegliere 3 ovociti da fecondare di ottima qualità. I criteri per la selezione ovocitaria sono sia affidati al biologo, per una valutazione morfologica e biochimica

degli ovociti, sia all'ecografista, per lo studio morfologico e vascolare dei follicoli.

Numerosi sono gli Autori della letteratura internazionale che si sono occupati della vascolarizzazione perifollicolare (PFBF).

La qualità ovocitaria è sensibile al danno ipossico e una buona ossigenazione appare essere un fattore determinante per il miglioramento del tasso d'impianto. È stato suggerito che l'ipossia intrafollicolare, risultato di una inappropriata vascolarizzazione perifollicolare, potrebbe causare riduzione del metabolismo e più basso pH intracellulare, riducendo la fertilizzazione, incrementando l'incidenza dei disordini citoplasmatici e cromosomici e di conseguenza dando vita ad embrioni con blastomeri multinucleati e con limitate capacità di sviluppo.

Al contrario, embrioni con più alto tasso di impianto sembrano originare da follicoli ben vascolarizzati e ben ossigenati. Chui et al., 1997, ha mostrato una stretta relazione tra grado di vascolarizzazione perifollicolare, valutato con tecnica power Doppler al giorno del prelievo ovocitario, e tasso di impianto embrionario. Il tasso di fertilizzazione e gravidanza è stato significativamente più alto per gli ovociti ottenuti da follicoli con alto grado di vascolarizzazione perifollicolare. Bhal et al, 1999, ha sottolineato come il tasso di triploidia era significativamente più basso e quello di fertilizzazione significativamente più alto negli ovociti derivanti da follicoli con alto grado di vascolarizzazione.

Un recente studio italiano, Palomba et al, 2006, condotto su 27 donne giovani non obese con fattore tubarico di sterilità o infertilità

inspiegata, pur confermando la relazione positiva tra vascolarizzazione perifollicolare e tasso di impianto, ha considerato come tale valutazione fosse priva di significato clinico se eseguito in donne giovani e senza patologie di base da cui si otterrebbero comunque tre ovociti di buona qualità.

Shrestha et al, nel 2006, ha studiato la vascolarizzazione perifollicolare non solo al giorno del pick up ma in tutta la fase follicolare precoce, al fine di identificare precocemente i cicli con buona qualità ovocitaria. Egli ha dimostrato come in un ovaio con follicoli di piccola (5-10 mm) e media (10-15 mm) taglia con alta PFBF nella fase follicolare iniziale, fossero poi presenti follicoli grandi (>15 mm) con alta PFBF e quindi alto pregnancy rate.

Anche lo studio degli indici di pulsatilità e resistenza nei vasi stromali intraovarici (IOA) è stato messo in relazione alla qualità ovocitaria. Durante lo sviluppo follicolare, infatti, i vasi stromali ovarici sono i primi a nutrire i follicoli preantrali. Molti Autori hanno studiato tale aspetto sottolineando una relazione positiva tra il flusso precoce nei vasi stromali ovarici e la risposta ovocitaria; un più basso PI delle arterie intraovariche nei primi giorni del ciclo (giorno 2 o 3) è stato trovato associato a una più grande crescita follicolare e a un più alto numero di oociti reclutati.

Bassil et al, ha dimostrato come un più basso RI nelle IOA due giorni prima dell'iniezione di hCG fosse associato ad un migliore sviluppo ovocitario.

Shrestha et al, 2006 ha sottolineato come il PI e l'RI dei vasi intraovarici nella fase follicolare tardiva fossero significativamente più bassi nelle pazienti con migliore PFBF.

Du et al. ha messo in relazione PI ed RI dei vasi intraovarici con grado di luteinizzazione e stress ossidativo dei follicoli ovarici, valutato con l'apoptosi delle cellule della granulosa, sia il giorno della somministrazione dell'hCG, sia il giorno del pick up. Nel giorno della aspirazione follicolare è stata trovata una correlazione positiva tra PI, RI e tasso di ovociti maturi, mentre tali indici sono negativamente correlati all'apoptosi cellulare. Nel giorno della somministrazione dell'hCG gli indici del PI ed RI sono stati trovati negativamente correlati solo al numero totale di oociti reclutati. Questi dati possono implicare che la valutazione del PI ed RI dei vasi stromali intraovarici il giorno della somministrazione di hCG può essere predittiva per il numero di ovociti che possono essere reclutati.

La Doppler flussimetria ha trovato applicazione, nel campo della fecondazione assistita, anche nella valutazione della recettività endometriale, studiando sia gli indici di pulsatilità e resistenza delle arterie uterine, sia e soprattutto, la vascolarizzazione endometriale e subendometriale (EBF).

Il ruolo dell'impedenza dell'arteria uterina, sia il giorno della somministrazione dell'hCG, sia il giorno del pick up, è rimasto incerto, generando l'idea che la qualità dell'endometrio potrebbe essere più importante del flusso globale attraverso l'intero utero.

Una scarsa recettività endometriale sembra infatti essere associata ad un basso flusso endometriale, valutato sia il giorno della

somministrazione dell'hCG (24,25), sia il giorno del pick up che dell'embryo transfer.

Zaidi, 1999, ha valutato la presenza e l'assenza della vascolarizzazione sub e intra endometriale al giorno della somministrazione dell'hCG, riportando l'impossibilità di avere una gravidanza in pazienti con flusso assente sub o intraendometriale.

Kupesic, 2001, ha riscontrato un PI dei vasi endometriali significativamente più basso nel gruppo di pazienti risultate poi gravide rispetto a quelle non gravide.

Chien et al, 2002, ha valutato tre gruppi di pazienti: gruppo A, senza flusso endometriale o subendometriale, gruppo B, solo flusso subendometriale, gruppo C, flusso sia sub che endometriale, riportando un tasso di gravidanza notevolmente più elevato nelle pazienti di gruppo C rispetto ai gruppi A e B.

Yang et al, 1999, studiando 95 donne sottoposte a IVF, ha riportato come le pazienti con un'area di flusso endometriale valutata con Power Doppler (EPDA) $> 5 \text{ mm}^2$ avevano un tasso di gravidanza significativamente più alto rispetto a pazienti con area $< 5 \text{ mm}^2$ o con flusso assente.

Contart et al, 2000, è l'unico autore a riportare risultati contrastanti il resto della letteratura. Valutando la vascolarizzazione endometriale in 185 pazienti sottoposte a ICSI, ha riportato infatti una differenza non significativa tra tasso di impianto e gradi di vascolarizzazione.

Con l'utilizzo del color Doppler in bidimensionale le informazioni circa la vascolarizzazione ed il flusso ematico dell'organo studiato sono ottenute da una singola arteria posta su un piano bidimensionale

scelto dall'operatore. Per ottenere una misurazione accurata dei parametri velocimetrici l'angolo di insonazione del vaso dovrebbe essere conosciuta. Nell'ovaio le arterie sono sottili e tortuose per cui tale operazione risulterebbe indaginosa.

Il power Doppler con ecografia 3D essendo meno angolo dipendente ha una migliore riproducibilità intra e interosservatore nel mappaggio e nella quantificazione del segnale Doppler dell'intero volume di interesse; si ottengono così informazioni sulla vascolarizzazione e i flussi ematici dell'intero organo.

IL software VOCAL utilizzato per il calcolo del volume utilizza tre indici di vascolarizzazione: VI, FI, VFI, che riflettono rispettivamente la densità di vascolarizzazione, il flusso ematico e la perfusione tissutale.

Kupesic, 2002, ha dimostrato come l'FI dello stroma ovarico dopo soppressione ipofisaria sia più alto nelle donne che hanno ottenuto una gravidanza rispetto a quelle in cui la tecnica è fallita e che tale parametro correla con il volume dell'organo.

Pan et al., 2003-2004 hanno dimostrato che VI, FI e VFI al giorno della somministrazione di hCG sono più alti nel gruppo di donne iper-responsive al trattamento. Jarvela et al., 2004 hanno osservato che VI ed VFI sono più alti in caso di successo della tecnica solo al giorno della somministrazione di hCG dopo stimolazione con gonadotropine. In uno studio del 2006 Mercè conferma che l'FI è correlato alla qualità embrionaria, come dimostrato da Kuriac nel 2002.

Recentemente il power Doppler con ecografia tridimensionale è stato utilizzato anche per lo studio dei flussi endometriali e

subendometriali; l'FI endometriale al giorno del transfer embrionario è più alto nei cicli con outcome positivo; il VFI subendometriale, misurato il giorno della somministrazione di hCG, è più sensibile nel predire il risultato della tecnica rispetto al volume endometriale e al VI e FI subendometriale. VI e VFI endometriale e subendometriale sono bassi 2 giorni dopo la somministrazione di hCG, ma più alti dopo 7 giorni in pazienti con eccessiva risposta rispetto a quelle con risposta moderata.

Lo sviluppo follicolare è un processo complesso regolato da numerosi fattori locali che agiscono sotto l'influsso delle gonadotropine e degli steroidi ovarici. Diverse citochine, il fattore di crescita vascolare endometriale (VEGF), il fattore di necrosi tumorale TNF- α e la leptina, sono state indagate come fattori influenzanti la maturazione ovocitaria e la qualità embrionaria. Proprio la leptina è la molecola che maggiormente ha destato l'interesse di studio dato il suo importante ruolo nella riproduzione.

La leptina è una proteina solubile, derivata dagli adipociti, di 16 kDa, appartenente alla classe delle citochine ad elica. È prodotta dal gene dell'obesità (Ob) e svolge un ruolo regolatorio nell'assunzione del cibo e nella spesa energetica. I suoi livelli circolanti sono correlati alla massa adiposa.

Il gene della leptina, sia umano che murino, è strutturato in tre esoni separati da due introni. Gli esoni 2 e 3 contengono la regione codificante l'ormone.

L'mRNA del gene ob è espresso in grandi quantità negli adipociti, laddove i livelli circolanti di ormone sono proporzionali al numero ed

alla grandezza degli stessi. Livelli più bassi sono stati riscontrati nel muscolo cardiaco, nello stomaco, nella placenta, nella mammella e, più di recente, in altri organi, quali le cellule della granulosa ed il trofoblasto.

La leptina viene secreta in modo pulsatile con una media di circa 32 pulses in 24 ore. E' stata inoltre osservata l'esistenza di un ritmo circadiano di secrezione che, analogamente a quanto si osserva per l'ormone stimolante la tiroide e la prolattina, mostra un nadir nel corso del giorno e uno zenit durante la notte.

La leptina ha un ruolo regolatorio sul ritmo fame-sazietà, modulando, in funzione dello stato nutrizionale, l'assunzione di cibo e la spesa energetica.

Esistono dati che dimostrano una significativa correlazione inversa tra livelli di ormone ed secrezione di cortisolo, in soggetti magri ed obesi, sia a digiuno sia dopo i pasti; tali riscontri lasciano ipotizzare che la leptina possa sopprimere a livello del SNC l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. È stato inoltre dimostrato nei roditori come iniezioni sottocutanee di idrocortisone provocano una sensibile diminuzione dell'introito calorico, associata a perdita di peso. Effetti analoghi sono stati osservati anche nell'uomo a seguito della somministrazione di idrocortisone, triamcinolone e desametasone. Questi effetti sembrano essere riconducibili alla presenza di siti di legame per i glucocorticoidi a livello del promotore del gene ob: il legame dei glucocorticoidi a questi siti aumenterebbe la trascrizione del gene e conseguentemente la biosintesi di leptina.

La regolazione dell'assunzione di cibo sembra inoltre essere riconducibile ad ulteriori effetti centrali, mediati dalla leptina, a livello delle regioni ipotalamiche deputate alla regolazione del ritmo fame-sazietà, in particolare tramite l'espressione di geni target di STAT3, quali c-fos e c-jun, nonché dei geni che codificano per il neuropeptide Y (NPY) ed il cocaina and amphetamine-regulated transcript (CART). I livelli circolanti di leptina sono significativamente più elevati, anche nella specie umana, negli individui di sesso femminile. Tale riscontro è verosimilmente legato alla produzione di estrogeni. Numerosi studi hanno dimostrato come l'incubazione in vitro di tessuto adiposo di ratto con estrogeni, si rifletta in un aumento, tempo e dose-dipendente, della espressione e della secrezione di leptina. Tale effetto si è maggiormente riscontrato nel tessuto adiposo di animali di sesso femminile: dopo stimolazione con 50 nM di estrogeni, la produzione di leptina mostra un incremento del 75% nelle femmine e del 34% nei maschi, laddove non sono riscontrabili differenze significative nel rilascio di ormone tra i due sessi, in condizioni basali di coltura. I pochi studi condotti su adipociti umani mostrano risultati analoghi: l'estradiolo sembra essere in grado di promuovere la secrezione di leptina in vitro da parte di colture di tessuto adiposo, esclusivamente derivanti da individui di sesso femminile. Nella specie umana un maggior rilascio di leptina da parte di adipociti in coltura derivanti da soggetti femminili è riscontrabile anche in condizioni basali, in assenza di stimolazione estradiolica.

Sebbene i meccanismi che sono alla base dell'attività dell'estradiolo nella regolazione del rilascio di leptina non siano noti, si ritiene che

alcune componenti, quali la presenza di una sequenza consenso dell'elemento responsivo agli estrogeni nel promotore del gene *ob* e la presenza di molecole leganti gli estrogeni ad elevata affinità nella frazione citosolica dei diversi tessuti adiposi, giocano un ruolo chiave.

L'esistenza di un legame tra quantità/distribuzione di tessuto adiposo e sistema riproduttivo è ampiamente riconosciuta. Una ipotesi interessante è che la leptina rappresenti un segnale periferico in grado di notificare l'adeguatezza dello stato nutrizionale ai fini dell'espletamento della funzione riproduttiva.

In topi sottoposti a digiuno forzato la caduta dei livelli plasmatici di leptina coincide con importanti cambiamenti neuroendocrini che si riflettono in un compromissione della funzione riproduttiva. La somministrazione di leptina esogena ripristina la fertilità. Nel topo femmina con assenza congenita di leptina si osserva ipogonadismo centrale ed anovulazione cronica. Tale condizione è revertita dal trattamento con leptina ricombinante, ma non dalla restrizione di cibo. È stato ipotizzato che anche nella donna la relazione tra stato nutrizionale e funzione riproduttiva fosse riconducibile alla leptina. Tale ipotesi nasce anche dal riscontro di fluttuazioni fisiologiche di questo ormone nelle varie fasi del ciclo mestruale, laddove i livelli circolanti risultano significativamente più bassi all'inizio della fase follicolare.

È interessante osservare come un inadeguato apporto nutrizionale nell'età adulta possa riflettersi in anomalie della funzione ovulatoria, verosimilmente riconducibili ad interferenze neuroendocrine con la

cinetica di secrezione del GnRH (gonadotrophin-releasing hormone). Tuttavia va evidenziato che nei soggetti con concentrazione ematiche di leptina < 3 ng/ml e quantità di tessuto adiposo $< 15\%$, l'incidenza di anovulazione cronica risulta significativamente più elevata.

La funzione riproduttiva è ugualmente compromessa in presenza di eccessivo apporto nutrizionale. Nelle donne obese è frequente il riscontro di una sindrome dell'ovaio policistico in associazione ad una condizione di anovulazione cronica. In questi soggetti è stato riscontrato un incremento significativo dei livelli circolanti di leptina verosimilmente correlabile con l'incremento della produzione di androgeni ovarici.

Tuttavia il ruolo svolto dalla leptina nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio e le relazioni esistenti tra attività della molecola, secrezione di ormone luteinizzante (LH) e concentrazioni di estradiolo restano tuttora oggetto di studio.

Alcuni autori hanno recentemente ipotizzato che, oltre a meccanismi centrali, la leptina abbia anche un ruolo periferico regolando direttamente la funzione degli organi riproduttivi. Evidenze in tal senso derivano dal modello della PCOS: alti livelli di leptina potrebbero contribuire all'infertilità neutralizzando gli effetti sensibilizzanti dell'IGF-1 nei follicoli dominanti.

Studi in vitro hanno rilevato alcuni effetti della leptina sulla regolazione della steroidogenesi nell'ovaio. In primo luogo è stata dimostrata l'esistenza di una sotto-popolazione di cellule della granulosa in grado di produrre ed accumulare leptina e fattori di crescita in corso di follicologenesi. Recenti studi hanno dimostrato

che la leptina, in maniera dose dipendente, inibisce la produzione di progesterone, stimolata dalla gonadotropina corionica (hCG) nelle cellule della granulosa luteinizzata umana.

Questo effetto inibitorio è evidenziabile solo quando le cellule della granulosa sono coltivate in presenza di insulina ed è verosimilmente riconducibile ad un antagonismo sull'azione della stessa.

Tali evidenze hanno suggerito l'esistenza di una attività simil apocrina mediata dalla leptina all'interno del follicolo ovarico umano.

Al fine di meglio comprendere le correlazioni esistenti tra la leptina e la produzione di ormoni ipofisari ed ovarici alcuni autori hanno impiegato il modello sperimentale, in vivo, rappresentato dalle tecniche di procreazione assistita (PMA). Tali metodiche sono precedute da una fase di iperstimolazione ovarica controllata (IOC) basata sulla somministrazione di gonadotropine esogene al fine di ottenere una crescita follicolare multipla mediante il superamento delle dinamiche che sono alla base della selezione del follicolo dominante.

La somministrazione di gonadotropine si riflette nella produzione e rilascio di estradiolo (E2) da parte delle cellule della granulosa presenti nei differenti follicoli in accrescimento con un innalzamento dei livelli di questo ormone anche di venti volte in 10-15 giorni circa. Parallelamente all'incremento di E2 nelle fasi più avanzate della IOC si registra un aumento del progesterone (P4). L'entità e la rapidità delle variazioni ormonali in corso di IOC rendono tale modello un contesto ideale per valutare la correlazione tra andamento dei livelli sierici di steroidi ovarici e di leptina. Le prime esperienze condotte in

questo campo sono state proposte da Butzow, 1999: gli autori hanno evidenziato come l'aumento dei livelli sierici di leptina, in corso di IOC, sia proporzionale alla percentuale di grasso corporeo e correlato positivamente alla produzione di P4. Non sembra esservi invece alcuna correlazione con l'estradiolo. In tale studio si è evidenziata una correlazione negativa tra incremento percentuale (confronto tra rilevazioni effettuate ad inizio trattamento ed al giorno del prelievo ovocitario) dei livelli sierici di leptina ed esito della risposta ovarica alle gonadotropine esogene, in termini di numero medio di ovociti recuperati.

Tali evidenze suggeriscono un ruolo di modulazione della risposta ovarica alle gonadotropine mediato dalla leptina stessa. Gli autori ipotizzavano che essa fosse coinvolta nei meccanismi che sono alla base della resistenza ovarica alle gonadotropine esogene frequentemente osservata nei soggetti obesi.

Studi successivi sono stati finalizzati a valutare eventuali correlazioni tra concentrazioni di leptina nei fluidi follicolari (recuperati al momento del pick up) e outcome dei cicli di riproduzione in vitro. I dati che emergono da tali sperimentazioni sembrano supportare l'ipotesi di una correlazione inversa tra livelli intra-follicolari di leptina e tassi di gravidanza, sia in pazienti normali sia in pazienti affette da PCOS.

Uno studio recente ha evidenziato livelli di leptina significativamente più elevati in quei follicoli i cui ovociti sono stati fertilizzati rispetto ai follicoli con ovociti non fertilizzati. Tale affermazione sembra essere in contrasto con gli studi precedentemente pubblicati in letteratura.

Questa discrepanza potrebbe essere legata al fatto che gli studi precedenti avevano un disegno differente e non valutavano la relazione tra la concentrazione di leptina di un singolo follicolo e relativa quantità ovocitaria.

Un recente lavoro ha messo in relazione i livelli intrafollicolari di leptina con la vascolarizzazione perifollicolare nella selezione degli ovociti nelle tecniche di fecondazione assistita, riportando livelli più bassi nei follicoli con più alta PFBF.

L'ecografia transvaginale nella predizione del parto pretermine.

Negli ultimi anni il ricorso alle tecniche di riproduzione assistita per l'ottenimento della gravidanza nelle coppie infertili risulta essere in aumento. Diversi autori in letteratura riportano un'augmentata prevalenza nelle gravidanze ottenute da "Assisted reproductive technologies" (ART) di complicanze perinatali quali malformazioni congenite, aberrazioni cromosomiche, gravidanze multiple e parto pretermine.

Numerosi studi hanno evidenziato come l'età materna, in genere più elevata nelle gravide da ART, e le cause stesse della sterilità, possano essere considerati come fattori predittivi di un aumento del rischio di certe patologie materno-fetali.

Bosso e Baird, 2003, hanno evidenziato come, in relazione all'età materna e alla parità, sia presente un rischio di 1,4-1,8 volte più elevato di parto pretermine in donne che hanno avuto una gravidanza dopo più di un anno di attesa.

Il parto pretermine è una importante complicanza delle gravidanze da ART. Si definisce parto pre-termine o prematuro l'espulsione del feto e dei suoi annessi prima della 37^a settimana di gestazione o dopo il 180° giorno fino al 259° giorno completo a partire dall'inizio dell'ultima mestruazione.

Rappresenta la maggiore causa di mortalità e morbilità perinatale e sebbene la sopravvivenza dei nati pretermine sia aumentata grazie al miglioramento dell'assistenza neonatale, persiste tuttavia la problematica della patologia cronica.

La sopravvivenza al parto è inferiore al 5% prima della 23^a settimana raggiungendo il 95% dopo la 32^a settimana. Parimenti, la morbilità decresce dal 60% per i nati prima della 23^a settimana a meno del 5% dopo la 32^a settimana.

In Europa l'incidenza complessiva sembra essere di circa il 6 % di cui circa il 95% sottoposto a cure ospedaliere specialistiche, è potenzialmente trattabile. Questo principio è applicabile però solo a pazienti che si trovano in uno stadio precoce del travaglio, escludendo quindi dal trattamento un 10% di pazienti che si trovano ad uno stadio avanzato dello stesso; vi è inoltre un ulteriore 50% di pazienti che non possono essere sottoposte a terapia con tocolitici o per presenza di rottura delle membrane dopo la 32^a settimana di gestazione o per un'età gestazionale superiore alle 35 settimane. A tale epoca, infatti, i progressi della medicina neonatale rendono meno rischioso il parto pretermine rispetto al prosieguo della gestazione. Ritardare la nascita pretermine significa non solo diminuire i riflessi psicologici e sociali correlati con il problema, ma anche ridurre i costi economici derivanti da cure neonatali intensive e protratte nel tempo. Il “costo” di una nascita pretermine deve essere valutato sia in un contesto psico-sociale che in un ambito prettamente economico; bisogna tener presente infatti le forti ripercussioni che un parto pretermine può avere sul bambino, con l'insorgenza di difficoltà di apprendimento o invalidità, e sui genitori nei quali queste complicanze causano stress emotivi molto forti e disagi spesso a lungo termine.

Nonostante l'alto rischio di parto pretermine comunemente osservato nelle gravidanze ottenute da ART sia principalmente legato alla

gravidanza plurima, tale problematica è stata riscontrata anche nelle gravidanze singole ottenute da tecniche di fecondazione assistita. Tale rischio risulta inoltre essere significativamente più alto nelle gravidanze ottenute con “high technology” (ICSI/FIVET) rispetto a quelle ottenute con “low technology” (induzione dell’ovulazione, inseminazioni).

I due fattori ritenuti principali responsabili dell’aumentato rischio di parto pretermine nelle gravidanze singole da ART sono l’avanzata età materna e la primiparità, entrambe caratteristiche della popolazione in studio. Vari cofattori responsabili dell’infertilità, quali le malformazioni uterine, le pregresse procedure operative cervicali ed uterine nonché la patologia pelvica femminile, infiammatoria ed infettiva, e la patologia autoimmune, con il conseguente aumento delle interleuchine (IL-1 beta, IL 8) e la successiva cascata prostaglandinica, costituiscono ulteriori fattori di rischio per il parto pretermine.

Studi recenti hanno evidenziato una maggiore prevalenza del parto pretermine nelle pazienti sottoposte a tecnica FIVET rispetto a quelle sottoposte a tecnica ICSI per fattore puro di sterilità maschile.

Nelle coppie sottoposte ad ICSI per fattore “puro” di sterilità maschile, infatti, la mancanza dei cofattori su descritti potrebbe, in parte, spiegare la sovrapponibilità dell’incidenza del parto pretermine tra questa sottopopolazione e la popolazione generale. Il fattore cervicale sembra giocare un ruolo importante nella sottopopolazione di pazienti sottoposte a tecnica FIVET, per l’influenza di questi cofattori di infertilità.

Le cause che determinano l'inizio di un travaglio pretermine sono ancora oggetto di discussione, tuttavia l'insorgenza ed il mantenimento delle contrazioni sembra ormai certo dipendere dall'armonica espansione del segmento uterino inferiore e dalla dilatazione del canale cervicale. Indipendentemente comunque dalla causa scatenante, quando il travaglio di parto è stato messo in moto questo procede in maniera autonoma e difficilmente arrestabile, per l'entrata in funzione di una serie concatenata di meccanismi di autoregolazione.

Il processo di ripening cervicale è legato ad un profondo rimodellamento della matrice extracellulare (MEC) cervicale. Il meccanismo che dà inizio a tale processo sia nel travaglio a termine che in quello pretermine al momento è sconosciuto. La cervice umana è composta di tessuto connettivo che consiste principalmente di collagene, elastina e glicosamminoglicani. I cambiamenti cervicali sono legati ad un aumento della vascolarizzazione cervicale, della concentrazione di acqua, una disorganizzazione del collagene con una riduzione del contenuto di collagene stesso e di elastina e un aumento della concentrazione di acido ialuronico ed eparan solfato. Tutte queste modifiche determinano la riduzione di consistenza della cervice con conseguente raccorciamento e dilatazione durante il travaglio di parto. La ristrutturazione della MEC è attribuita al rilascio di proteasi dalle cellule infiammatorie quali macrofagi e leucociti. Pertanto si osserva una elevata concentrazione di citokine pro-infiammatorie in particolare IL-1, IL-6, IL-8 e delle metallo-proteasi MMP 8 e MMP 9.

In particolare l' IL-8 sembra la più coinvolta nel processo di ripening cervicale. In uno studio eseguito nel 2004, Chwalisz K ha dimostrato come l' applicazione locale di IL- 8 dia inizio al processo di ripening cervicale nei roditori.

L'identificazione precoce del vero travaglio di parto, cioè prima che avvenga un appianamento con dilatazione cervicale è spesso difficile. Pertanto l'American College of Obstetricians and Gynecologists nel 1997 ha proposto i criteri per documentare e porre diagnosi di parto pretermine.

Il parto pretermine si identifica con la presenza di contrazioni uterine registrate tra 22 e 37 settimane di gestazione con un ritmo di 4 in 20 min o 8 in un'ora con progressive modificazioni del collo uterino, e/o una dilatazione cervicale ≥ 2 cm e/o rottura prematura delle membrane.

La visita ostetrica è scarsamente predittiva di parto pretermine con un valore di falsi positivi del 40%. La mancanza di efficacia dell'esame cervicale legato soprattutto alle variazioni soggettive inter-intra osservatore, suggerisce che non può essere considerato un test per identificare le donne a rischio di parto pretermine.

In tal senso, un ruolo cruciale sembra essere svolto dalla misurazione ecografica transvaginale della lunghezza cervicale durante il secondo trimestre di gravidanza.

È un test riproducibile e di facile esecuzione.

Lo studio con ecografia transvaginale della cervice uterina nella popolazione generale e, in particolare, nelle pazienti a rischio di parto pretermine, si sta dimostrando un indice clinico molto promettente,

sia sul versante della profilassi, sia nella gestione clinica delle pazienti. Jams, nel 1995, ha sottolineato come la misurazione sistematica della cervice uterina con ecografia transvaginale sembri essere uno dei test predittivi più adeguati di parto pretermine.

Nella valutazione ecografica transvaginale della cervicometria è importante introdurre la sonda in modo cauto e attento allo scopo di non comprimere la cervice. La lunghezza del collo uterino viene valutata misurando la distanza fra OUI (orifizio uterino interno) e OUE (orifizio uterino esterno), che ecograficamente corrisponde alla linea iperecogena determinata dalla presenza di muco e dalla giustapposizione delle pareti anteriore e posteriore del canale cervicale. Il diametro longitudinale della cervice deve essere valutato sia con paziente a riposo sia imprimendo una modesta pressione fundica lungo l'asse longitudinale dell'utero. Devono essere considerati come risposta patologica il raccorciamento della cervice stessa, l'ampliamento dell'OUI e la comparsa o l'ampliamento del funneling, inteso come dilatazione del canale endocervicale con erniazione delle membrane.

Numerosi studi sono stati condotti nel corso degli anni per definire il ruolo della lunghezza della cervice nella predizione del parto pretermine.

Nel 1990, Andersen ha valutato 113 gravidanze a medio e a basso rischio prima della 30^a settimana, per valutare se il raccorciamento della cervice uterina identificasse le gravide a maggior rischio di parto pre-termine. Durante il suo studio ha evidenziato che una misura

inferiore al 10° percentile (minore di 39 mm) risultava associata a un rischio aumentato di parto pre-termine.

Nel 1993, Murakawa ha valutato 32 gravide con minaccia di parto pre-termine tra la 25^a e la 35^a settimana, facendo riferimento ad uno schema costruito con i dati di 177 gravide normali. Le pazienti sintomatiche, con una lunghezza cervicale inferiore ai 20 mm hanno partorito tutte pre-termine, quelle con una cervice maggiore di 35 mm hanno partorito tutte a termine. Nel 1994 Jams ha studiato 60 gravide con minaccia di parto pre-termine; le 24 pazienti che hanno partorito prima della 36^a settimana avevano un collo inferiore a 30 mm. Jams stabiliva come la percentuale di parto pretermine fosse di 6,5 volte aumentata nelle gravide con lunghezza della cervice minore 25mm e con età gestazionale < 35 settimane, e di 7,7 volte in quelle con stessa lunghezza cervicale ma con età gestazionale < 32 settimane.

Leitch, in una ricerca di trentacinque studi prospettici dove è stata valutata con ecografia transvaginale la lunghezza cervicale e le modificazioni dell' OUI in pazienti con attività contrattile, concludeva come tale metodica fosse efficace per la valutazione del rischio di parto pre-termine con una sensibilità tra il 68% e il 100% e VPN tra 72 e 100%.

Gomez, nel 1994, studiando donne ricoverate per minaccia di parto pre-termine, ha ribadito come una lunghezza cervicale di 25 mm fosse da considerarsi il principale fattore di rischio nel monitoraggio di queste pazienti, evidenziando nella presenza di funneling un ulteriore rischio aggiuntivo.

Le gravidanze multiple rappresentano uno specifico sottogruppo tra le pazienti ad alto rischio.

Per quanto riguarda le gravidanze gemellari, Kushnir, 1990, ha fornito un nomogramma di riferimento fra la 14^a e la 37^a settimana.

Gli autori hanno evidenziato un andamento simile fra le gravidanze singole e gemellari dalla 14^a alla 19^a settimana. Dopo questo periodo, la cervice misurata nelle gravidanze gemellari è risultata sempre significativamente più corta che nelle gravidanze singole senza differenza tra nullipare e pluripare.

La differenza della lunghezza della cervice uterina riscontrata nelle gravidanze gemellari e singole, in media, è risultata di 9 mm nel periodo di gestazione compreso tra la 20^a e la 37^a settimana.

Yang in uno studio del 2000, sulla valutazione della lunghezza cervicale tra la 22^a e la 24^a settimana in gravidanza bigemina, ha affermato che sia la lunghezza cervicale inferiore a 30 mm che il funneling, fossero variabili indipendenti e fortemente correlate con un parto pre-termine prima di 34 settimane.

Questi risultati sono stati confermati da Guzman in uno studio condotto nel 2000 su gravidanze bigemine, che ha sottolineato come una lunghezza cervicale minore di 20 mm risultasse valida nel predire un parto prima della 34^a settimana. Recentemente, nel gennaio 2004, Nicolaides et al, ha pubblicato uno studio condotto su 87 pazienti con gravidanza gemellare che presentavano regolari contrazioni uterine tra la 24^a e la 36^a settimana di gestazione. Le pazienti sono state sottoposte all' ecografia transvaginale per la misurazione della

lunghezza cervicale, notando come una lunghezza della cervice uterina inferiore a 25 mm fosse predittiva per un parto entro 7 giorni.

La valutazione della lunghezza cervicale nelle gravidanze a rischio permette l'uso preventivo di farmaci tocolitici, come l'atosiban o la ritodrina, associati o meno al cerchiaggio cervicale allo scopo di ritardare l'evento parto pretermine.

I linea di ricerca: l'ecografia transvaginale nella valutazione della cavità uterina nella donna infertile.

Scopo della ricerca

Scopo di questa ricerca è stato di validare la capacità diagnostica dell'ecografia transvaginale nello studio della valutazione della cavità uterina, sia nelle lesioni occupanti spazio che nella patologia malformativa.

Sono state eseguite in un arco di tempo di circa due anni più di 500 ecografie vaginali per patologia cavitaria. Da tale esperienza sono state ricavate le immagini e i criteri diagnostici riportati nel capitolo "Patologia benigna dell'utero", in: Ecografia transvaginale, E.L.I Medica Editore, 2008, Cap. 4, pag. 29-43.

Nell'ambito delle malformazioni uterine obiettivo della ricerca è stato quello di convalidare la capacità dell'ecografia transvaginale, con applicazione del power Doppler, di una corretta diagnosi differenziale tra utero setto e utero bicorni. Il segno ecografico "gamma sign", rappresentato da un singolo vaso arterioso mediano, identificato in una nostra precedente esperienza, sembra infatti presente nel caso di utero bicorni, mentre una vascolarizzazione disarrangiata intercavitaria è presente in caso di utero setto. Scopo di questo studio è stato proprio verificare se questa particolare vascolarizzazione possa essere rilevata in tutti i casi di utero bicorni e se possa pertanto essere realmente usata per differenziare i due tipi di malformazione uterina.

Risultati

Utero bicorni e utero setto. Diagnosi differenziale con USG 2D e 3D Power Doppler.

Materiali e metodi

In cinque anni (2003-2008) sono state selezionate 120 pazienti con diagnosi di utero malformato. Le pazienti, nullipare, omogenee per età (età media 30 anni), erano state studiate per la preparazione a tecniche di fecondazione assistita e tutte avevano già una diagnosi isteroscopica e laparoscopica di malformazione uterina. 69 pazienti erano affette da utero setto e 51 da utero bicorni unicolle. Le pazienti sono state sottoposte ad ecografia transvaginale bidimensionale e tridimensionale, con applicazione Power Doppler, durante la fase secretiva del ciclo mestruale. Sono stati utilizzati ecografi Philips HD 11 e un Accuvix Madison con sonde transvaginali 5-7.5 Mhz. I parametri Doppler sono stati: frequenza di ripetizione di impulso 2-10 kHz, filtro di parete 50 hz, box sulla regione di interesse di 3-6 cm.

Una sezione trasversa dell'utero permetteva la valutazione delle due emicavità. Su questa sezione è stata applicato il Power Doppler per la valutazione della vascolarizzazione intercavitaria, sia in 2D che 3D. Tutte le valutazioni sono state eseguite dallo stesso operatore (G.N.) in cieco. Dieci pazienti, affette anche da formazione ovarica sospetta, sono state sottoposte a ecografia con mezzo di contrasto di II generazione (SonoVue, Bracco Imaging) e valutate con ecografo dedicato (Esaote, Esatune con tecnica CnTI).

Risultati

L'ecografia 2D e 3D ha mostrato in tutti i casi la presenza di una cavità bipartita.

Il Power Doppler, sia all' USG-TV 2D che 3D, mostrava una vascolarizzazione irregolare o del tutto assente sulla linea mediana intercavitaria in 69 pazienti. Tutte queste pazienti erano affette da utero setto.

Le rimanenti 51 pazienti mostravano all'ecografia transvaginale 3D una caratteristica vascolarizzazione con singolo vaso mediano arterioso mimante la lettera greca gamma derivante dalla fusione delle branche principali delle arterie uterine, identificato come γ sign . Solo in 42 di queste pazienti l'ecografia 2D TV permetteva la stessa diagnosi. Le 51 pazienti erano affette da utero bicorni.

Il mezzo di contrasto ha mostrato un singolo vaso mediano in 4 casi e una vascolarizzazione irregolare in sei casi; le pazienti risultavano affette rispettivamente da utero bicorni e utero setto.

Il Power Doppler, applicato all'ecografia tridimensionale, nella nostra esperienza, ha consentito di formulare diagnosi differenziale tra utero setto e utero bicorni con una sensibilità e specificità pari al 100%.

L'applicazione del Power Doppler all'USG TV 3D sembrerebbe pertanto sufficiente nella diagnosi differenziale tra le due principali malformazioni uterine.

Si sta ora approfondendo l'aspetto embriogenetico delle malformazioni uterine al fine di meglio comprendere l'anomala vascolarizzazione.

I dati saranno successivamente pubblicati.

LA PATOLOGIA UTERINA BENIGNA

P. Laviscio, G. Nazzaro, M. Vallone, M. Locci

L'introduzione nella pratica clinica delle moderne sonde endovaginali ad alta frequenza ha permesso di ottenere immagini di precisione e finezza prima impensabili, apportando un notevole contributo allo studio dell'endometrio e del miometrio. Il miglioramento continuo delle tecniche Doppler, color e power, l'introduzione dell'ecografia tridimensionale, con la possibilità di visualizzazione del piano coronale, hanno reso negli ultimi anni l'ecografia transvaginale uno strumento indispensabile nella diagnostica e nella ricerca di patologie ginecologiche. Inoltre, la minima se non nulla invasività di questo esame, quasi sempre ben accetto dalla paziente, ha spinto i ginecologi e gli operatori stessi ad ottenere il maggior numero di informazioni possibili, cercando di sostituire, dove possibile, l'ecografia transvaginale ad esami più invasivi quali l'isterosalpingografia o l'isteroscopia.

La patologia uterina benigna, sia essa endometriale che miometriale, ha un grosso impatto sociale essendo una delle prime cause di sanguinamento anomalo in pre e in post-menopausa, di dolore pelvico, nonché una delle importanti concause di sterilità femminile.

Il sanguinamento uterino anomalo (AUB) è uno dei principali sintomi che conduce una donna in pre- e postmenopausa a consultare il ginecologo. Distinguiamo un sanguinamento di tipo disfunzionale, che richiede trattamento medico, da un sanguinamento su base organica, causato da una varietà di patologie uterine o sistemiche, che richiede uno specifico management per lo più chirurgico. Le più frequenti cause di AUB sono i polipi, i miomi sottomucoosi e l'iperplasia endometriale.

La prevalenza delle lesioni benigne intracavitari è di circa il 35% in età fertile. Gredmark (1995) ha riportato, invece, come la più comune causa di sanguinamento vaginale postmenopau-

sale sia l'atrofia endometriale (49.9%), seguita dall'iperplasia endometriale nel 9.8% dei casi, dai polipi nel 9.2%, e dall'adenocarcinoma nell'8.1%.

Per molti anni la dilatazione e il curettage della cavità uterina (D & C) è stato il metodo di scelta per la diagnosi e il trattamento di patologie endometriali in donne con sanguinamento anomalo. Con l'avvento delle tecniche endoscopiche, l'isteroscopia con biopsia si è rivelata superiore al curettage nell'accuratezza diagnostica delle anomalie intracavitari. Entrambe rappresentano tecniche invasive che richiedono, spesso, anestesia locale o generale con notevoli costi e scarsa compliance della paziente.

Nello studio della patologia cavitaria l'ecografia transvaginale ha sicuramente un ruolo principe.

Se l'isteroscopia con biopsia rappresenta infatti il gold standard per la valutazione della cavità uterina, l'ecografia transvaginale è sicuramente il metodo alternativo non invasivo più accurato comunemente utilizzato per lo studio dell'endometrio.

Sono stati condotti diversi studi al fine di comparare l'accuratezza diagnostica dell'ecografia transvaginale, della sonoisterografia e della isteroscopia nella patologia cavitaria. Laddove alcuni autori non riconoscono all'ecografia transvaginale una reale utilità nella valutazione dello spessore endometriale nelle pazienti in premenopausa, altri hanno dimostrato, nelle pazienti in pre e post menopausa con sanguinamento anomalo, la potenzialità diagnostica dell'ecografia vaginale, paragonandola a quella dell'isteroscopia (tab. 4.1).

L'ecografia transvaginale fornisce una serie di informazioni sulle lesioni uterine: localizzazione e identificazione, tipizzazione ecostrutturale, valutazione della grandezza ed estensione, caratterizzazione istologica delle lesioni stesse.

II linea di ricerca: l'ecografia transvaginale nei cicli di riproduzione assistita. Miglioramento del tasso di impianto.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo di questa parte del progetto di ricerca è stata la convalida dell'importanza dell'ecografia transvaginale nel campo della fecondazione assistita.

In tre anni più di 500 pazienti sterili avviate a protocolli di stimolazione o fecondazione assistita, sono state sottoposte ad ecografia transvaginale. Le immagini e i criteri diagnostici ottenuti sono stati inseriti nel capitolo di libro "Ecografia transvaginale nella medicina della riproduzione", in: Ecografia transvaginale, E.L.I. Medica editore, 2008, Cap. 13, pag. 143-158.

Il miglioramento del tasso di impianto è stato un ulteriore obiettivo, in particolare lo studio della vascolarizzazione perifollicolare con tecnica power Doppler, correlata ai livelli intrafollicolari di leptina come marcatori di qualità ovocitaria.

Ad eccezione del lavoro pubblicato da De Placido et al, 2006, i lavori finora presenti in letteratura su relazione tra tasso di impianto e leptina intrafollicolare si sono basati sul dosaggio delle leptina sul pool ottenuto dall'aspirazione di più follicoli.

In questo lavoro, seppur con risultati preliminari, è stato correlato il dosaggio di leptina alla vascolarizzazione follicolare di ogni singolo follicolo.

Risultati

Leptina e vascolarizzazione perifollicolare. Sue applicazioni nei cicli IVF.

Materiali e metodi

Sono state arruolate 15 pazienti infertili sottoposte a tecniche di fecondazione assistita ovvero a fecondazione in vitro e trasferimento di embrioni (FIVET) o ad iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI).

Sono state arruolate donne eumenorroiche (cicli ogni 24-35 giorni con una variabilità intra-individuale di ± 3 giorni) e con evidenza isteroscopica di normale cavità uterina. Le pazienti sono state sottoposte ad esami di laboratorio ed indagini strumentali al fine di identificare condizioni patologiche di tipo metabolico, autoimmune, genetico o infettivo.

Le pazienti sono state sottoposte a stimolazione ovarica controllata (IOC) secondo il long protocol con agonisti del GnRH ed FSH ricombinante. Sono state oggetto di studio solo le donne con un normale profilo di risposta alla IOC (recupero di almeno 4 ovociti e riscontro di un picco estradiolico ematico > 1500 pg/ml).

I criteri di esclusione adottati sono stati:

- elevate concentrazioni basali di FSH (bFSH al 3° giorno di un ciclo mestruale spontaneo > 10 UI/l).
- età > 36 anni.
- indice di massa corporea (BMI) > 25 .

- evidenza biochimica e/o ultrasonografica di sindrome dell'ovaio policistico.
- stadio III-IV dell'endometriosi, in accordo con la classificazione dell'American Society for Reproductive Medicine:
- disordini autoimmuni o cromosomici.
- presenza di un unico ovaio.

Gli ovociti sono stati prelevati tramite aspirazione ecoguidata, per via transvaginale, dopo 35 ore dall'iniezione di hCG in condizioni standard, dopo un minimo di 12 ore ed un massimo di 14 ore di digiuno.

L'aspirazione del follicolo è stata preceduta dallo studio ecografico, mediante ecografo Hitachi H21, delle dimensioni del follicolo e della vascolarizzazione perifollicolare con tecnica power Doppler. Per la classificazione della PFBF è stata utilizzata la scala fornita da Chiu (grado I, 0-25% della circonferenza follicolare colorata al Power Doppler; grado II, 26-50%; grado III, 51-75%, grado IV: 76-100%). È stato campionato un solo follicolo per ovaio scegliendo, indipendentemente dalla vascolarizzazione, il follicolo con diametro superiore ai 17 mm in posizione corticale più vicino rispetto alla sonda, al fine di consentire un più facile prelievo.

Una corretta valutazione della concentrazione di leptina di un singolo follicolo richiede che il fluido in esso contenuto non sia contaminato da materiale proveniente da altri follicoli. Se consideriamo, nell'ambito del sistema di aspirazione a pressione negativa, il "volume

morto” rappresentato dal lume dell’ago e dal tubo di connessione, si comprende come il primo materiale raccolto in ciascuna provetta rappresenti il residuo, contenuto in tale volume, del fluido follicolare aspirato immediatamente prima.

Per ovviare a questo bias al termine dell’aspirazione di ogni follicolo è stato praticato il lavaggio del circuito con una quantità fissa, nota, di terreno di coltura.

Tale procedura elimina la possibilità di contaminazione dei fluidi follicolari dei differenti follicoli ma obbliga l’operatore a pungere l’ovaio per ogni prelievo follicolare. Per questo motivo la scelta di un follicolo per ovaio.

I fluidi follicolari sono stati centrifugati per 5 minuti a 2000 rpm; il sopranatante recuperato, è stato sottoposto a dosaggio immunoenzimatico delle leptina.

Risultati

Dei trenta follicoli studiati 18 presentavano grado di vascolarizzazione III o IV, accomunati nel gruppo A. Il gruppo B è stato formato con 12 follicoli presentanti PFBF di grado I o II. I livelli medi di leptina intrafollicolare non sono risultati significativamente differenti tra le pazienti di gruppo A rispetto al gruppo B (23.3 vs 22.1 ng/ml, $p > 0.01$). Dei trenta follicoli studiati in 9 (5 del gruppo A e 4 del gruppo B) non è stato ritrovato l’ovocita. Delle 15 pazienti studiate solo in due, del gruppo A, si è avuta una gravidanza.

I risultati ottenuti sono esigui in numero e allo stato non significativi, non permettendo una correlazione tra leptina, qualità embrionaria e

tasso di fertilizzazione soddisfacente. La difficoltà tecnica dello studio della vascolarizzazione perifollicolare in un tempo antecedente il pick up (non in sala operatoria) e quindi il riconoscimento dello stesso ovocita da parte dell'operatore in sede di prelievo rappresenta sicuramente un bias nello studio. Tale errore potrebbe essere risolto con lo studio intraoperatorio dei follicoli, ma nella pratica clinica, soprattutto allo scopo di ridurre al minimo i tempi di anestesia per la pazienti sempre al fine di migliorare la qualità ovocitaria, è di notevole difficoltà.

Lo studio comunque continua al fine di ottenere un campione più numeroso e dati maggiormente significativi.

ECOGRAFIA TRANSVAGINALE E RIPRODUZIONE ASSISTITA

R. Poppiti, G. Nazzaro, P. Laviscio, T. Palmieri, G. De Placido

Introduzione

L'impiego degli ultrasuoni nella medicina della riproduzione risale agli anni '70, in cui l'ecografia transaddominale a vescica piena veniva utilizzata per il monitoraggio dell'ovulazione sia in cicli spontanei che indotti.

Dagli anni '80 si è verificato un incremento esponenziale dell'utilizzo della sonda transvaginale ad alta frequenza che, permettendo un migliore approccio agli organi pelvici, è diventato un insostituibile mezzo diagnostico e terapeutico nello studio delle donne affette da problemi di sterilità.

In tale ambito l'ecografia svolge un ruolo di primo piano. Le sue principali applicazioni riguardano:

- La valutazione degli organi pelvici.
- La valutazione del ciclo ovarico ed endometriale.
- Il monitoraggio dello sviluppo follicolare sia in cicli spontanei che indotti associati o meno a tecniche di procreazione assistita.
- L'agoaspirazione follicolare ed il trasferimento ecoguidato intrauterino degli embrioni per via transcervicale.

Valutazione degli organi pelvici

La valutazione ecografica iniziale di una paziente sterile viene effettuata durante la fase follicolare del ciclo, al fine di identificare eventuali fattori uterini, ovarici, meccanici o cervicali di sterilità (fig. 13.1).

Il fattore uterino è responsabile nel 9,5% dei casi di sterilità. Attraverso l'esame ecografico è possibile identificare la presenza di malformazioni uterine, patologie miometriali e patologie endometriali, la cui trattazione è rimandata ai capitoli relativi (fig. 13.2).

Il fattore ovarico è coinvolto nel 10-20% dei casi. L'esame ecografico consente di individuare alterazioni della normale funzionalità ovarica (anovulazione, insufficienza della fase luteale, sindrome del follicolo luteinizzato non rotto), cisti ovariche o paraovariche, endometriosi ovarica, ovaie multifollicolari e micropolicistosi ovarica (figg. 13.3, 13.4).



Fig. 13.1 Follicolo preovulatorio. La posizione polare, il contenuto transonico ed i margini tesi e regolari sono le caratteristiche di tali formazioni.



Fig. 13.2 Utero bicorne unico.

III linea di ricerca: l'ecografia transvaginale nella predizione del parto pretermine nelle gravidanze ottenute da tecniche di fecondazione assistita.

Scopo della ricerca:

In questa linea di ricerca si è voluta validare la capacità diagnostica dell'ecografia transvaginale nella predizione del parto pretermine. In particolare in un sottogruppo di pazienti come quelle derivanti da tecniche di fecondazione assistita, si è utilizzata tale metodica al fine di individuare precocemente le pazienti a rischio e sottoporle alle più opportune terapie tocolitiche quali l'Atosiban, antagonista recettoriale dell'ossitocina, o il progesterone micronizzato.

I risultati ottenuti sono stati pubblicati nell'articolo dal titolo "Atosiban vs ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at high risk on the basis of transvaginal ultrasound scan", Journal of Obstetrics and Gynaecology, July 2006; 26 (5): 396-401.

OBSTETRICS

Atosiban vs ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at high risk on the basis of transvaginal ultrasound scan

M. LOCCI, G. NAZZARO, A. MERENDA, M. L. PISATURO, P. LAVISCIO, R. POPPITI, M. MIRANDA, A. STILE, & G. DE PLACIDO

University of Naples Federico II, Naples, Italy

Summary

Our objective was to compare the effectiveness and safety of atosiban and ritodrine, in pregnancies obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) undergoing cervical cerclage. Data from a prospective study were compared with those from a retrospective study. Sixteen ICSI pregnant women, 20–24 weeks' gestation and maternal age > 18 years, received atosiban (bolus dose 6.75 mg i.v., followed by 300 µg/min i.v. for 3 h and 100 µg/min i.v. for 45 h). Cervical cerclage was performed 3 h after starting atosiban. The control group (group B) of 16 ICSI pregnant women were matched and received ritodrine hydrochloride (100–350 µg/min) for 48 h. Cervical cerclage was performed after 24 h. Pre-term rupture of membranes occurred within 48 h of cervical cerclage in one woman receiving atosiban and in four women receiving ritodrine. There was no significant difference in terms of pregnancies not delivered at 48 h (short-term tocolysis) and at 7 days (long-term tocolysis). However, there was a significantly higher incidence of maternal tachycardia with ritodrine compared with atosiban ($p < 0.001$). The mean gestational age at delivery was significantly higher for atosiban compared with ritodrine (36 vs 33 weeks; $p < 0.001$). The neonatal outcome was poorer for ritodrine than atosiban, as there were very low birth weight infants ($p = 0.008$), resulting in lower Apgar scores ($p = 0.005$) and there were more neonates requiring a long stay in the neonatal intensive care unit ($p = 0.005$). We conclude that atosiban is associated with a significantly lower incidence of maternal tachycardia and improved neonatal outcome compared with ritodrine.

Introduction

Pre-term delivery occurs in 8–10% of all births and accounts for approximately 80% of early neonatal morbidity and death (Hall et al. 1997; Lopez-Bernal and Tamby Raja 2000). Extremely pre-term infants are at risk of cerebral palsy and at a later stage behavioural, fine motor and learning difficulties. As a consequence, reducing pre-term birth is a primary goal in perinatal healthcare. Advances in medical treatment have allowed the prolongation of pregnancy in women at risk of early delivery. However, during the last two decades, the number of pregnancies at high risk for pre-term delivery has escalated as a result of the increase in multifetal pregnancies due to *in-vitro* fertilisation programmes.

Multiple pregnancies have premature uterine sensitivity to oxytocin due to uterine overdistention. In addition, pre-term and low birth weight deliveries are more common in singleton pregnancies conceived after ovulation induction and assisted reproductive technology (ART) than in singleton pregnancies conceived spontaneously (Perri et al. 2001). For example, pre-term low birth weight and very low birth weight was increased 1.4–3.5-fold in women who conceived after fertility treatment. These observations

suggest that singleton or multiple pregnancies arising from ART are at high risk of pre-term delivery.

On the basis of these considerations, at-risk pregnancies, such as those resulting from intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), should be treated to improve pregnancy outcome. Options for prophylaxis include supplemental tocolytic agents, assessment of cervical incompetence and/or short cervix by transvaginal ultrasound and screening for genital tract infections. Of the tocolytic agents currently available, atosiban, an oxytocin antagonist, has been shown to be the most effective and safe (Worldwide Atosiban vs Beta-agonists Study Group 2001; Romero et al. 2000; Valenzuela et al. 2000). Parturition is the consequence of a complex interplay of fetal and maternal factors (Okazaki et al. 1981; Bleasdale et al. 1983; Olson et al. 1983; Warrick et al. 1985; Di Renzo et al. 1984). Cervical incompetence represents one of these factors. The risk of spontaneous pre-term birth proportionally increases with shortening of the cervical length between gestational weeks 16 and 32 (Bibbi et al. 1979; Hassan et al. 2000; Macdonald et al. 2001; Guzman et al. 2001). The cervix is found to be dilated and effacing with bulging membranes in the absence of uterine contraction or bleeding. The true incidence of this condition is unknown. The onset of spontaneous pre-term labour

Correspondence: M. Locci, Via Domenico Fontana 27, I-80128 Naples, Italy. E-mail: nazzaro18@tin.it

ISSN 0144-3615 print/ISSN 1364-6893 online © 2006 Informa UK Ltd.

DOI: 10.1080/01443610600719883

TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA E PARTO PRETERMINE: FIVET ED ICSI A CONFRONTO. NOSTRA ESPERIENZA

Maria Laura Pisaturo, Paola Laviscio, Giovanni Nazzaro, Giuseppe De Placido, Antonella D'Ambra, Mariavittoria Locci

Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Area Funzionale di Chirurgia Ostetrica e Ginecologica, Laparotomia ed Endoscopica, Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia

Introduzione

Negli ultimi anni il ricorso alle tecniche di riproduzione assistita per l'ottenimento della gravidanza nelle coppie infertili risulta essere in aumento. Diversi autori in letteratura riportano un'aumentata prevalenza nelle gravidanze ottenute da "Assisted reproductive technologies" (ART) di complicanze perinatali quali malformazioni congenite, aberrazioni cromosomiche, gravidanze multiple e parto pretermine (1). Il parto pretermine rappresenta la maggiore causa di mortalità e morbilità perinatale; sebbene la sopravvivenza dei nati pretermine sia aumentata grazie al miglioramento dell'assistenza neonatale, persiste tuttavia la problematica della patologia cronica. Nonostante l'alto rischio di parto pretermine comunemente osservato nelle gravidanze ottenute da ART sia principalmente legato alla gravidanza plurima (2), tale problematica è stata riscontrata anche nelle gravidanze singole ottenute da tecniche di fecondazione assistita (3,4). Tale rischio risulta inoltre essere significativamente più alto nelle gravidanze ottenute con "high technology" (ICSI/FIVET) rispetto a quelle ottenute con "low technology" (induzione dell'ovulazione, inseminazioni) (5,6).

Abbiamo voluto riportare la nostra esperienza circa la prevalenza del parto pretermine nella popolazione di pazienti afferenti al nostro centro di gravidanza a rischio sottoposte ad ART, confrontando le gravidanze ottenute da *in vitro fertilization embryo transfer* (FIVET) con quelle ottenute da *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI).

Materiali e metodi

Da Maggio 2000 ad Aprile 2003 presso il Reparto di Gravidanza a rischio dell'area funzionale di Chirurgia ostetrica e Ginecologica, Laparotomia ed Endoscopia, Centro di Sterilità di Coppia dell'Università di Napoli "Federico II", abbiamo seguito 104 gravidanze singole ottenute da ART di cui 55 da FIVET -gruppo A- e 49 da ICSI, per fattore maschile di sterilità puro, - gruppo B-. I due gruppi si presentavano omogenei per età, parità e fattori di rischio anamnestici di parto pretermine.

Le pazienti sono state sottoposte alla 22a settimana a tampone vaginale e ad ecografia vaginale per la valutazione della lunghezza della cervice uterina e della presenza o meno di funneling, inteso come dilatazione dell'orifizio uterino interno ad imbuto.

Tali valutazioni sono state ripetute a 30 settimane. La presenza di eventuale attività contrattile è stata documentata con tocografia.

Sono state escluse le pazienti con rottura prematura delle membrane.

Le pazienti con lunghezza della cervice a 22 settimane inferiore a 25 mm e a 30 settimane inferiore ai 30 mm e/o con presenza di funneling e/o con attività contrattile registrata al cardiocostrografo, sono state sottoposte a terapia tocolitica con Atosiban secondo schema posologico standard: iniziale iniezione endovenosa di 6,75 mg in un minuto seguita da un'infusione continua di 18 mg/ora per tre ore e da una successiva infusione di 6 mg/ora per un periodo massimo di 45 ore.

I parametri cervicometrici alla 22a e alla 30a settimana sono stati confrontati con test *t-student*; il numero di parti prima della 34 settimana dei due gruppi è stato confrontato con test χ^2 .

Risultati

Nel gruppo A 18 pazienti hanno partorito prima della 34 settimana, di cui 3 prima della 30a w. Sei pazienti del gruppo B hanno partorito prima della 34a w, di cui una prima della 30° settimana.

La differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$).

Le pazienti del gruppo A hanno presentato, a 22 w, valori della cervicometria compresi tra 15 e 40 mm (v.m. 25,47); le pazienti del gruppo B valori compresi tra 20 e 45 mm (v.m. 30,69). La differenza è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$).

Alla 30^a settimana i valori della cervicometria sono risultati compresi tra 16 e 40 mm (v.m. 25,8) per le pazienti del gruppo A e tra 22 e 42 mm (v.m. 30,86) per le pazienti del gruppo B ($p < 0.05$).

Conclusioni

Le gravidanze singole da ART sono ad aumentato rischio di parto pretermine rispetto alle gravidanze spontanee; i due fattori ritenuti i principali responsabili di tale dato sono l'avanzata età materna e la primiparità, entrambe caratteristiche della popolazione in studio. Vari cofattori responsabili dell'infertilità, quali le malformazioni uterine, le pregresse procedure operative cervicali ed uterine nonché la patologia pelvica femminile, infiammatoria ed infettiva e la patologia autoimmune, con il conseguente aumento delle interleuchine (IL 1beta, IL 8) e la successiva cascata prostaglandinica, costituiscono ulteriori fattori di rischio per il parto pretermine. Nelle coppie sottoposte ad ICSI per fattore "puro" di sterilità maschile la mancanza di tali cofattori potrebbe, in parte, spiegare la sovrapposibilità dell'incidenza del parto pretermine tra questa sottopopolazione e la popolazione generale (7). I risultati di questo studio hanno evidenziato una maggiore prevalenza del parto pretermine nelle pazienti sottoposte a tecnica FIVET rispetto a quelle sottoposte ad ICSI per fattore di sterilità maschile puro, in accordo con quanto evidenziato dalla letteratura. Il fattore cervicale sembra giocare un ruolo importante nella sottopopolazione di pazienti sottoposte a tecnica FIVET, per l'influenza dei cofattori di infertilità sopra citati. La modifica della cervicometria, come emerge anche da questo studio, è strettamente correlata al parto pretermine. La cervice è stata trovata dilatata e/o con funneling anche in assenza di attività contrattile uterina o di sanguinamento vaginale. Le modifiche cervicali insieme alla formazione delle gap junctions, all'incremento dei recettori dell'ossitocina, all'aumentata produzione deciduale di prostaglandine, con il conseguente aumento del calcio intracellulare, sono i meccanismi alla base del parto pretermine (8). L'uso di antagonisti recettoriali dell'ossitocina, come nella nostra esperienza, agendo sui meccanismi fisiopatologici del parto pretermine, rappresenta il presidio terapeutico di scelta nelle pazienti con modifiche della cervice.

Nonostante la bassa sensibilità, riportata da alcuni autori, della valutazione della lunghezza cervicale nella predizione del parto pretermine (9), riteniamo necessaria una sua valutazione nelle gravidanze da FIVET per l'individuazione delle pazienti a rischio da sottoporre a terapia tocolitica.

Bibliografia

1. Van Voorhis BJ. *Outcomes from assisted reproductive technology*. Obstet Gynecol. 2006 Jan;107(1):183-200
2. Bergh T., Ericson A., Hillensjo T., Nygren K.G. and Wennerholm U.B. *Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden. 1982-95: a retrospective cohort study*. Lancet, 354, 1579-1585. 1999
3. Wang J.X., Clark A.M., Kirby C.A. et al. *The obstetric outcome of singleton pregnancies following in-vitro fertilization/gamete intra-Fallopian transfer*. Hum. Reprod., 9, 141-146. 1994.
4. Koudstaal J., Braat D.D., Bruinse H.W., Naaktgeboren N., Vermeiden J.P. and Visser G.H. *Obstetric outcome of singleton pregnancies after IVF: a matched control study in four Dutch university hospital*. Hum. Reprod. 15, 1819-1825. 2000.
5. Wang J.X., Norman R.J. and Kristiansson P. *The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth*. Hum. Reprod., 17, 4, 945-949. 2002
6. Perri T., Chen R., Yoeli R. et al. *Clinical assisted reproduction. Are singleton assisted reproductive technology pregnancies at risk of prematurity?* J Ass Reprod and Genet., 18, 5, 245-249. 2001

7. Wennerholm UB., Bergh C., Hamberger L., Nilsson L., Reisner E., Wennergren M., Wikland M. *Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection.* Hum Reprod 1996;11:1113-1119.
8. Locci M., Nazzaro G., Merenda A. et al. *Atosiban vs ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at high risk on the basis of transvaginal ultrasound scan.* Journal of Obstetrics and Gynaecology, July 2006; 26(5): 396 – 401
9. Rozenberg P, Gillet A, Ville Y. *Transvaginal sonographic examination of the cervix in asymptomatic pregnant women: review of the literature.* Ultrasound Obstet Gynecol. 2002 Mar;19(3):302-11

PROGESTERONE MICRONIZZATO PER VIA VAGINALE NELLA TERAPIA DI MANTENIMENTO DELLE GRAVIDANZE BIGEMINE A RISCHIO DI PARTO PRETERMINE. NOSTRA ESPERIENZA.

(presentato al I congresso FIOG, Roma, Novembre 2008)

Pisaturo Maria Laura, Nazzaro Giovanni, Laviscio Paola, Merenda Antonietta, Palmieri Teresa, Locci Mariavittoria, De Placido Giuseppe

Università degli Studi di Napoli Federico II. Dipartimento di Emergenze Ostetriche e Ginecologiche e Medicina della Riproduzione. Centro di Ecografia e Diagnosi Prenatale.

Introduzione: Il 18% delle gravidanze bigemine è il risultato di una tecnica di riproduzione assistita e di queste il 15% esita in un parto pretermine. Il progesterone sembra prevenire il parto pretermine in gravidanze singole con ridotta lunghezza cervicale ma non esistono studi che validino l'utilizzo del progesterone micronizzato per via vaginale nelle gravidanze bigemine.

Obiettivi: valutare l'efficacia del progesterone micronizzato per via vaginale nella terapia di mantenimento, in un gruppo di pazienti con gravidanza bigemina da ART a rischio di parto pretermine già trattate, per un solo ciclo, con antagonisti recettoriali dell'ossitocina (Atosiban).

Materiali e metodi: 36 gravidanze bigemine da ART, sono state sottoposte alla 22^aw ad ecografia vaginale per la valutazione della lunghezza della cervice uterina. Le pazienti (pz) con cervicometria ≤ 22 mm sono state trattate con Atosiban. La popolazione è stata poi divisa in due gruppi in modo randomizzato: gruppo A, 18 pz sottoposte a terapia di mantenimento con progesterone micronizzato per via vaginale al dosaggio di 200 mcg/die; gruppo B, 18 pz senza terapia di mantenimento. In tutte è stato effettuato follow up clinico ed ecografico. Sono state confrontate la lunghezza cervicale alla 28^a w e l'epoca gestazionale al parto con test t-student ($p < 0,05$).

Risultati: le pz del gruppo A hanno mostrato una lunghezza cervicale media alla 28^a w di 20 mm (18-22 mm), con un'età gestazionale media al parto di 35 w (33-36 w). Nel gruppo B la lunghezza cervicale media alla 28^a w di 15 mm (13-16 mm), con un'età gestazionale al parto di 33 w (29-35 w). Per entrambi i parametri la differenza tra i gruppi A e B è risultata statisticamente significativa.

L'alto rischio di parto pretermine nelle gravidanze multiple da ART impone un adeguato trattamento. L'Atosiban riduce il ripening cervicale e nelle gravidanze bigemine, in cui trova in parte controindicazione l'uso di altri tocolitici, rappresenta il trattamento di scelta. Studi recenti dimostrano come l'uso del progesterone per via vaginale, nelle pz con ridotta cervicometria, sia associato ad una significativa riduzione delle nascite pretermine nelle gravidanze singole. Il nostro lavoro, seppur limitato nel numero dei casi, sembra giustificare l'utilizzo di questo tocolitico anche nelle gravidanze bigemine come terapia di mantenimento.

Discussione

Da quando nel 1978 nacque in Inghilterra Louise Brown, la prima bambina concepita in provetta, le tecniche di fecondazione in vitro (IVF) hanno subito notevoli modificazioni, evolvendosi al punto da non riprodurre solo in vitro il processo della fecondazione ma da sostituirsi completamente ad esso. Eppure, nonostante i grossi passi in avanti compiuti, solo il 25% dei cicli IVF esita in una gravidanza.

L'ecografia transvaginale, sia con tecnologia bi che tridimensionale, apporta un notevole contributo al miglioramento del tasso di successo delle gravidanze nella donna infertile. La fine diagnostica sia delle patologie cavitari come i fibromi sottomucosi, i polipi, i setti uterini, le malformazioni complesse come l'utero bicornuto, il contributo alla selezione ovocitaria, la predizione delle complicanze ostetriche, come il parto pretermine, rende l'ecografia uno strumento utile ed indispensabile nello studio della paziente infertile e nelle gravidanze ottenute da tecniche di fecondazione.

Nel campo specifico dello studio della cavità uterina e della patologia malformativa, l'ecografia integrata 3D e color- power Doppler sembra, nella nostra esperienza, potersi sostituire a una diagnostica più invasiva rappresentata dalla laparoscopia- isteroscopia.

Nel campo della fecondazione assistita l'ecografia transvaginale è una tecnica non sostituibile. Da essa dipende tutta la valutazione dei cicli di stimolazione, il prelievo ovocitario nonché il miglioramento dei tassi di impianto studiando parametri sottili come la vascolarizzazione perifollicolare.

La cresciuta attenzione degli ultimi anni al parto pretermine ha aperto all'ecografia transvaginale un nuovo campo di applicazione. La possibilità di terapie tocolitiche come gli antagonisti recettoriali dell'ossitocina, che hanno meccanismi di azione selettivi con ridotti effetti collaterali, hanno indotto gli studiosi a considerare la possibilità non solo della terapia ma soprattutto della prevenzione del parto pretermine. L'ecografia transvaginale permette lo studio della cervice in modo semplice, facilmente riproducibile e poco costoso. La ridotta lunghezza cervicale o la presenza della dilatazione imbutiforme dell'orifizio uterino interno sono considerati fattori predittivi di parto pretermine anche in assenza di altri rilievi, sintomatologici o strumentali. Nelle pazienti con gravidanza ottenuta da tecnica o portatrici di patologia malformativa uterina, e come tali già considerate a rischio di parto pretermine, la valutazione ecografica transvaginale routinaria permette sicuramente l'identificazione tempestiva della minaccia d'aborto o parto prematuro e l'instaurarsi della più corretta terapia tocolitica precoce.

La tecnica tridimensionale applicata all'ecografia transvaginale negli ultimi anni ha aperto un nuovo mondo di imaging. L'impossibilità alla applicazione quotidiana della tecnica, legata all'alto costo degli ecografi ed alla ancora modesta esperienza degli operatori, limita sicuramente le sue capacità diagnostiche. Tuttavia la possibilità di ricostruzione del piano coronale, la rappresentazione dei volumi, l'uso di rendering particolari come l'invert, capace addirittura di visualizzare gli osti tubarici, lo studio vascolare con indici flussimetrici tridimensionali, apporta contributi diagnostici

significativi facendo dell'ecografia transvaginale uno strumento sempre più completo.

Per tutte queste sue capacità, la “resa” delle tecniche di fecondazione assistita e più in generale delle gravidanze nella donna infertile, risulta sicuramente migliorata dall'ecografia transvaginale, sia eseguita con tecnica bidimensionale, sia e soprattutto se integrata con l'ecografia in tre dimensioni.

BIBLIOGRAFIA – INTRODUZIONE - I LINEA DI RICERCA

Adamson D. Et al. World collaborative report on assisted reproduction technology, 1998. The parthenon Publishing group Ltd., UK, 2001:209-219.

Alborzi S., Dehbashi S., Parsanezhad M.E. Differential diagnosis of septate and bicornute uterus by sonohysterography eliminates the need for laparoscopy. *Fertil Steril* 2002 Jul; 78:176-178.

Anderson R.E., Nugent N.L., Gregg A.T., Nunn S.L., Behr B.R. Transvaginal ultrasound-guided embryo transfer improves outcome in patients with previous failed in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*; 77(4):769-75, 2002.

Ashton D., Amin H.K., Richart R.M., Neuwirth R.S. The incidence of symptomatic uterine anomalies in women undergoing transcervical tubal sterilization". *Obstet. Gynecol.* 1988; 72:28-30.

Arduini D. Trattato di ecografia in ostetricia e ginecologia.
Ed Poletto Cap XXII pag 518

Bacsko G., Major T. Hysteroscopic diagnosis and treatment of endometrial polyps. *Orv Hetil* 12:2041-2045, 1999.

Bakour S.H., Khan K.S., Gupta J.K. The risk of premalignant and malignant pathology in endometrial polyps. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:317-320, 2000.

Braun P. et al. Is hysterosalpingography able to diagnose all uterine malformations correctly? A retrospective study. *Eur J of Rad.*2005;53:274-279.

Breckenridge J.W, Kurtz A.B, Ritchie W.G., Macht EL Jr.
Postmenopausal uterine fluid collection: indicator of carcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 139:529-534, 1982.

Botsis D., Papagianni V., Makrakis E., Avarantinos L., Creatsas G.
Sonohysterography is superior to transvaginal sonography for the diagnostic approach of irregular uterine bleeding in women of reproductive age. *J Clinical Ultrasound*, 34(9), 434-439, 2006.

Bourne T., Hamberger L., Hahlin M., Granberg S.
Ultrasound in Gynecology: endometrium.
Int J Gynecol Obstet 56 (2): 115-127; 1997

In Cacciatore- Savelli. Ecografia transvaginale in ginecologia. Athena, 2001, cap 2, pag 25-27.

Cognazzo G. et al. Una nuova tecnica ultrasonografica per la valutazione della vescica e dell'uretra mediante scansione endovaginale. Atti 60° Congresso SIGO, 1, 1980.

Coleman B.G., Arge P.H., Grumbachb K. et al.: Transvaginal and transaddominal sonography: Prospective comparison. Radiology, 168:639, 1988.

de Vries L.D., Dijkhizen F.P., Mol B.W., Broilmann H.A., Moret E., Heintz A. Comparison of transvaginal sonography, saline infusion sonography, and hysteroscopy in premenopausal women with abnormal uterine bleeding. J Clinical Ultrasound, 28 (5): 217-223, Jun 2000.

Donnez O., Jadoul P., Squifflet J., Donnez J. Didelphic uterus and obstructed hemivagina: recurrent hematometra in spite of appropriate classic surgical treatment. Gynecol Obstet Invest. 63(2):98-101, 2007.

Emanuel MH., Verdel MJC., Stas H., Wamsteker K., Lammes FB. An audit of true prevalence of intrauterine pathology; the hysteroscopic findings controlled for patient-selection in 1202 patients with abnormal uterine bleeding. Gynaecol Endosc 4:237-241; 1995.

Emanuel MH., Verdel MJC., Wamsteker K., Lammes FB. A prospective comparison of transvaginal ultrasonography and diagnostic hysteroscopy in the evaluation of patients with abnormal uterine bleeding: clinical implications. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:547-52.

Epstein E., Ramirez A., Skoog L., Valentin L. Transvaginal sonography, saline contrast sonohysterography and hysteroscopy for the investigation of women with postmenopausal bleeding and endometrium > 5 mm. Ultrasound Obstet Gynecol; 18: 157-162, 2001.

Fedele L., Bianchi S., Dorta M., Vignali M. Intrauterine adhesions:detection with transvaginale US. Radiology 199:757-759, 1996.

Fedele L., Bianchi S., Marchini M., Franchi D., Tozzi I., Dorta M. Ultrastructural aspects of endometrium in infertile women with septate uterus. Fertil. Steril. 1996;65:750-2.

Fleisher A.C., Shappell H.W. Color Doppler sonohysterography of endometrial polyps and submucosal fibroids. J Ultrasound Med 22:601-604, 2003.

Friedler S., Margalioth E.J., Kafka I., Yaffe H. Incidence of post-abortion intra-uterine adhesions evaluated by hysteroscopy – a prospective study. Hum Reprod, 8, 442-444, 1993.

Giannacopoulos K., Troukis E., Constandinou P., Rozis I., Kokonakis C., Giannikos L. Hematometra and extended vaginal haematoma after laser conisation. A case report. *Eur J Gynecol Oncol.* 19(6):569-70, 1998.

Grigoris F., Grimbiz et al. Clinical implication of uterine malformations and hysteroscopic treatment results.. *Hum Repr Update;* 2001.7(1):161-174.

Healy DL, Trounson AO., Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 1994; 343:1539-1544.

Jakab A., Juhasz B., Ovari L., Major T., Birinyi L., Bacsko G. Power Doppler imaging in the diagnosis of endometrial polyps – the feeding vessels. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 12 Abstract Book, p. 14.

Jakab A., Ovari L., Juhasz B., Birinyi L., Bacsko G., Toth Z. Detection of feeding artery improves the ultrasound diagnosis of endometrial polyps in asymptomatic patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 119 (1):103-107, 2005.

Jasonini V.M., Matonti G., Papanelli S. tumori benigni e maligni dell'utero. In *Di Renzo – Ginecologia e Ostetricia*. Vol 2, pag 1864-1874, 2006.

Jayasinghe Y., Rane A., Stalewski H., Grover S. The presentation and early diagnosis of the rudimentary uterine horn. *Obstet Gynecol*, Jun;105(6):1456-67, 2005.

Kupesic S. Clinical implication sonographic detection of uterine anomalies for reproductive outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; Oct,18(4):387-400.

Lass A., Williams G., Abusheika N., Brindsen P. The effect of endometrial polyps on outcomes of in vitro fertilisation (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet* 16:410-415, 1999.

Lavergine N., Aristizabal J., Zarka V., Enry R., Hedon B. Uterine anomalies and in vitro fertilization: what are the results??. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1996. Sep;68(1-2):29-34.

Locci M., Nazzaro G. Tecniche Doppler. In: *Trattato di ecografia in Ostetricia e Ginecologia*, Paletto Editore, 1997.

Maneschi F., Marana R., Muzi L. et al. Reproductive performances in women with complete septate uteri. *J. Reprod. Med.* 1991; 36:741.

Maternal Department of Radiology, La Fe Hospital. Is hysterosalpingography able to diagnose all uterine malformations correctly? A retrospective study. *Eur J Radiol.* 2005 Feb;53(2):274-9.

Nazzaro G., Poppiti R., Locci M., Laviscio P., Merenda A., Pisaturo M.L., D' Ambra A., Cadente Colucci C., Conforti S., De Placido G. Utero setto vs utero bicornuto: diagnosi differenziale. nostra esperienza. Atti LXXXI SIGO- Bologna 2005.

Orvieto R., Bar-Hava I., Dicker D., Bar J., Ben-Rafael, Neri A. Endometrial polyps during the menopause: characterization and significance. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78:883-886, 1999.

Pabucci R., Gomel V.: "Reproductive outcome after hysteroscopic metroplasty in women with septate uterus and otherwise unexplained infertility". *Fertil. Steril.* 2004 Jun;81(6):1675-8.

Paul G., McDonough, M.D: Associate Editor. Predictive values of transvaginal sonography in specifying bicornuate and septate uterus?. *Fertil. Steril.* 2003 May;79(5):1254.

Pavoni M., Bana G. Utero: patologia benigna. In Arduini D. Trattato di ecografia in ostetricia e ginecologia. Paletto Editore, pp 641-650, 1997.

Pellerito J.S., McCarthy S.M., Doyle M.B., Glickman M.G., De Cherney A.H. Diagnosis of uterine anomalies: relative accuracy of MR imaging, endovaginal sonography, and hysterosalpingography. *Radiology* 1992;183:795-800.

Perez-Medina T., Bajo J., Huertas MA., Rubio A. Predicting atypia inside endometrial polyps. *J Ultrasound Med* 21:125-128, 2002.

Popp L.W . et al. Intravaginal Ultrashalldiagnostik. In : Judmaier (a cura di) Ultrashalldiagnostik, Thieme, Stoccarda, 1985.

Protopapas A., Shushan A., Magos A. Myometrial scoring: a new technique for the management of severe Asherman's syndrome. *Fertile Steril*, 69, 860-864, 1998.

Shushan A., Revel A., Rojansky N. How often are endometrial polyps malignant? *Gynecol Obstet Invest*; 58(4):212-5; 2004.

Sylvestre C. et al. A prospective study to evaluate the efficacy of two-and three-dimensional sonohysterography in women with intrauterine lesions. *Fertil Steril*, 2003. 79(5); 1222-5.

Timmerman D., Verguts J., Konstantinovic M.L., Moerman P., Van Schoubroeck D., Deprest J. The pedicle artery sign based on sonography with color Doppler imaging can replace second-stage test in women with abnormal bleeding. *Ultrasound Obstet Gynecol* 22:166-171, 2003.

Varasteh N.N., Neuwirth R.S., Levin B., Keltz M.D. Pregnancy rates after Hysteroscopic Polypectomy and myomectomy in infertile women. *Obstet. Gynecol.* 1999. Aug;94(2):168-71.

Wu M.H., Hsu C.C., Huang K.E. Detection of congenital müllerian duct anomalies using three-dimensional ultrasound. *J Clin Ultrasound* 1997;25:487-92

BIBLIOGRAFIA II LINEA DI RICERCA

Ahima RS et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997, 99:391-395.

Alcazar J.L., Castello G., Minguez J.A., Galan M.J.

Endometrial blood flow mapping using transvaginal power Doppler sonography in women with postmenopausal bleeding and thickened endometrium. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21:583-588.

Altundag M et al. Intraovarian stromal artery Doppler indices in predicting ovarian response. *J Reprod Med* 47886-890, 2002.

Amer A., Hammateh M.E., Kolkailah M., Ghandour A. Three dimensional versus two dimensional ultrasound measurement of follicular volume: are they comparable? *Arch Gynecol Obstet* 263:155-157, 2003.

Anderson R.E., Nugent N.L., Gregg A.T., Nunn S.L., Behr B.R. Transvaginal ultrasound-guided embryo transfer improves outcome in patients with previous failed in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*; 77(4):769-75, 2002.

Antczak M, Van Blerkom JV. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 1997, 3:1067-1086.

Bancsi L.F., Broekmans F.J., Looman C.W., Habbema J.D., te Velde E.R. Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 81:35-41, 2004.

Bassil S. et al. The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12:1240-1245, 1997.

Battaglia C., Genazzani A.D., Regnani G., Primavera M.R., Petraglia F., Volpe A.: Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders. *Fertil Steril* 74: 809-812, 2000.

Bergh T., Ericson A., Hillensjo T., Nygren K.G. and Wennerholm U.B. Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden. 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet*, 354, 1579-1585. 1999

Bhal PS et al. The use of transvaginal power Doppler ultrasonography to evaluate the relationship between perifollicular vascularity and outcome in in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum Reprod* 14, 939-945, 1999.

Boggio A. Italy enacts new law on medically assisted reproduction. *Hum Reprod* 20: 1153-1157.

Borini A. et al. Perifollicular vascularity and its relationship with oocyte maturity and IVF outcome. *Ann NY Acad Sci* 943, 64-67, 2001.

Brannian JD et al. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod* 1999, 14:1445-1448.

Butzow TL et al. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:3135-3139.

Cacciatore B., Simberg N., Fusaro P. et al.: Transvaginal Doppler study of uterine bloodflow in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*, 66: 130, 1996.

Campfield LA et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269:546-549, 1995.

Casabiell X et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women but not in men samples. *J Clin Endocrinol metab*, 1998, 83: 2149-2155.

Chang M.Y., Chiang C.H., Hsieh T.T., Soon Y.K., Hsu K.H.: Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 69:505-510, 1998.

Chien L.W., Lee W.S., Au H.K., Tzeng R.C.: Assessment of changes in utero-ovarian arterial impedance during the peri-implantation period by Doppler sonography in women undergoing assisted reproduction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 23: 496-500, 2004

Chien LW et al. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 78:245-251, 2002.

Chui DK. et al. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 12, 191-196, 1997.

Contart P et al. Power Doppler endometrial evaluation as a method for the prognosis of embryo implantation in an ICSI program. *J Assist Reprod Genet* 17(6):329-334, 2000.

Conti A, Delbon P.: Medically-assisted procreation in Italy. *Med Law* 24: 163-172, 2005.

Conway GS, Jacobs HS. Leptin: a hormone of reproduction, *Hum Reprod* 1997, 12(4):633-635.

Costello M.F., Sjoblom P., Shrestha S.M.: Use of Doppler ultrasound imaging of the ovary durino IVF treatment as a predictor of success. In Rao KA, Brinsdon PR and Sathananthan H (eds) *The infertility manual*. JAYPEE Brothers Medical, New Delhi: 344-349, 2004.

Coulam C.B., Rinehart J.S.,: Subendometrial flow. as a predictor of pregnancy after in vitro fertilization. *Fertil Steril*: 70(Suppl 1): S106-S107

Danninger B., Brunner M., Obruca A., Feichtinger W.: Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome by ultrasound volumetric assessment of baseline ovarian volume prior to stimulation. *Hum Reprod*, 11: 1597-1599, 1996.

De Placido G. et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* Sep 17(9): 2402-9, 2002 .

De Placido G. et al. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest* 2006, 29(8): 719-726.

Devenport L. et al. Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci* 1989, 45:1389-1396.

Devos R. et al. Induction of ob gene expression by corticosteroids, is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*, 1995: 27:15958-15961.

De Ziegler et al.: Vascular resistance of uterine arteries: physiological effects of estradiol and progesterone. *Fertil Steril*, 55:775, 1991.

Dickey R.P., Olar T.T., Curole D.N., Taylor S.N., Rye P.H.: Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 7:418-21, 1992

Fakih H., et al. : Ovarian cyst aspiration : a therapeutic approach to ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*, 58:829, 1992.

Finn PD. Et al. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 1998, 139: 4652-4662.

Glock J.L., Brumsted J.R.: Color flow pulsed Doppler ultrasound in diagnosis luteal phase defect. *Fertil Steril* 64:500-504, 1995.

Golan A., Ron-El R., Herman A. et al.: Ovarian hyperstimulation Syndrome : An update review. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 44 :430-440, 1989

Gregory L. Ovarian markers of implantation potential in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1998; 13(suppl 4):117-132.

Halaas JL et al. Weight- reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269:543-546, 1995.

Hardie L et al. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 1997, 47:101-106.

Hata K., et al.: Change in ovarian arterial compliance during the human menstrual cycle assessed by Doppler ultrasound. *Br. J. Obstet. Gynecol*; 97:163, 1990.

Hazzard TM, Stouffer RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:883-900, 2000.

Hendriks D.J., Mol B.W.J.M., Bancsi LFJMM, te Velde E.R., Broekmans F.J.M.: Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancies after in-vitro-fertilization: a meta analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 83:291-301, 2005.

Huang F.J., Chang S.Y., Tsai M.Y., Kung F.T., Wu J.F., Chang H.W. Determination of the efficiency of controlled ovarian hyperstimulation in the gonadotropin-releasing hormone agonist-suppression cycle using the initial follicle count during gonadotropin stimulation. *J Assist Reprod Genet*. 18:91-96, 2001

Jarvela I.Y., Sladkevicius P., Kely S., Ojha K., Campbell S, Nargund G. Comparison of follicular vascularization in normal versus polycystic ovaries during in vitro fertilization as measured using 3-dimensional power Doppler ultrasonography. *Fertil Steril* 82: 1358-1363, 2004.

Jarvela I.Y., Sladkevicius P., Tekay A.H., Campbell S., Nargund G.: Intraobserver and interobserver variability of ovarian volume, gray-scale and color flow indices obtained using transvaginal three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 21: 277-282, 2003.

Jokubkiene L., Sladkevicius P., Rovas L., Valentil L.: Assessment of changes in volume and vascularity of the ovaries during the normal menstrual cycle using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Hum Reprod Vol* 21, No.10:2661-2668, 2006.

Kratochwill A., Urban G., Friedrich F.: Ultrasonic tomography of the ovaries. *Ann Chir Gynecol Fenniae*, 61:211, 1972.

Kristiensen K. et al. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999°, 259:624-630.

Korbonits L. et al. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol* 1997, 46:751-757.

Kumar V., Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive elements as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1998, 55:145-156.

Kupesic S., Bekavac I., Bjelos D., Kurjak A.: Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color Doppler and three dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization procedures. *J Ultrasound Med* 20(2): 125-134, 2001.

Kupesic S., Kurjak A., Bjelos D., Vujisic S.: Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro outcome are related to age. *Fertil Steril* 79: 190-197, 2003.

Kupesic S, Kurjak A.: Uterine and ovarian perfusion during the periovulatory period assessed by transvaginal color Doppler. *Fertil Steril* 60: 439-443, 1993.

Kupesic S., Kurjak A.: Predictor of IVF outcome by three-dimensional ultrasound. *Hum Reprod Vol* 17, No4:950-955, 2002.

Kurjak A et al.: Transvaginal color flow Doppler in the assessment of ovarian and uterine blood flow in infertile women. *Fertil Steril*, 56:870, 1991

Kurjak A. Sonography of the uterus. In: Kurjak A (a cura di), Atlas of ultrasonography in Obstetrics and Gynecology. Mladost, Zagabria, 1986.

Lass A., Skull J., McVeigh E., Margara R., Winston R.M.: Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. Hum Reprod, 12:294-297, 1997.

Letterie G.S.: Three-dimensional ultrasound-guided embryo transfer: a preliminary study. Am J Obstet Gynecol, 192(6):1983-7; discussion 1987-8, 2005

Licinio J. et al. Human leptin are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. Nat Med 1997, 3:575-579.

Machinal F. et al. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. Endocrinology, 1999, 140:1567-1574.

Mahutte NG., Arici A. Failed fertilization: is it predictable? Curr Opin Obstet Gynecol 2003;15(3):211-218.

Mannucci E et al. Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. Eur J Endocrinol 1998, 139:198-201.

Mantzoros CS et al. Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 2000, 15:539-544.

Matarese G., De Placido G., Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. J Clin Endocrinol Metab, 2000, Jul; 85(7):2483-7

Mercé L. T., Alcazar J.L., Engels V., Troyano J., Bau S., Bajo J.M. Endometrial volume and vascularity measurements by transvaginal three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography in stimulated and tumoral endometrial: intraobserver reproducibility. Gynecol Oncol, 100 (3):544-550, Mar 2006

Mercè L.T., Bau S., Barco M.J., Troyano J., Gay R., Sotos F., Villa A. Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and Power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. Hum Reprod Vol 21, No5:1218-1226: 2006

Messinis IE et al. Leptin Concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1998; 13:1152-1156.

Messinis IE., Milingos SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod* 1999, 5:52-63.

In: Morrow C.P., Townsend D.E., Editors, *Gynecol Oncology*, Churchill Livingstone, New York, 1987.

Mounzih K. et al. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997, 138: 1190-1193.

Murakami T. et al. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 214:5301-5304.

Nakagawa K., Ozawa N., Takamatsu K., Takahashi T. et al.: A reduction in intraovarian arterial blood flow resistance after ovulation is necessary to achieve pregnancy in natural cycle. *J Assist Reprod Genet*: 22(1): 9-14, Jan 2005.

Nargund G. et al. Association between ultrasound indices of follicular blood flow, oocyte recovery and preimplantation embryo quality. *Hum Reprod* 11, 109-113, 1996.

Nazzaro G. et al. Power-Doppler evaluation of follicular vascularization and intrafollicular leptin levels in oocytes selection: preliminary report. *Ultrasound Obstet and Gynecol*, 24 (3):293, 2004.

Palomba S et al. Clinical use of the perifollicular vascularity assessment in IVF cycles: a pilot study. *Hum Reprod*, 21(4):1055-1061, 2006.

Pan H.A., Wu M.H. Cheng Y.C., Wu L.H., Chang F.M.: Quantification of ovarian Doppler signal in hyperresponders during in vitro fertilization treatment using three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 29: 921-927, 2003.

Pan H.A., Wu M.H. Cheng Y.C., Wu L.H., Chang F.M.: Quantification of ovarian stromal Doppler signals in poor responders undergoing in vitro fertilization with three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 190: 338-344, 2004.

Pineiro V. et al. Dihydrotestosterone, stanazolol, androstenedione and dehydropiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: lack effect of testosterone. *J Endocrinol*, 1999, 160: 425-432

Salat-Baroux J. et al: Ultrasonographic prediction of ovarian hyperstimulation after IVF. In: Maschiach S. et al. Editors.: *Advances Assisted Reproductive Technologies*. New York, Plenum Publishing: 559-565, 1990

Savouret L.J. et al. interplay between estrogen, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem*, 1994, 269: 28955-28962.

Schil R.L., Holthaus S., d'Alquen J., Fimmers R., Dorn C., van Der Ven H et al.: Quantitative assessment of subendometrial blood flow by three-dimensional-ultrasound is an important predictive factor of implantation in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 15: 89-94, 2000.

Scholtes M.C.W. et al.: Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal Doppler study. *Fertil Steril*, 52:981, 1989.

Sharara F.I., Lim J., McClamrock H.D.: The effect of pituitary desensitization on ovarian volume measurement prior in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14:183-185, 1999.

Shina MK et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation: studies in lean and obese subjects and during short term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282, 1996.

Shina MK. et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non insulin dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 1996, 97:1344-1347.

Shrestha S.M. et al. Power Doppler ultrasound assessment of follicular vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. *J Assist Reprod and Genetics*, 23 (4):161-169, 2006.

Shushan A., Revel A., Rojansky N. How often are endometrial polyps malignant? *Gynecol Obstet Invest*; 58(4):212-5; 2004.

Slieker L.J. et al. Differentiation method-dependent expression of leptin in adipocyte cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:225-229.

Steer C.V. et al.: The use of transvaginal color flow imaging after in vitro fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. *Fertil Steril*: 57: 372, 1992.

Sterzik K., Grab D., Sasse V, Hutter W., Rosenbusch B., Terinde R.: Doppler sonographic findings and their correlation with implantation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*: 52: 825-828, 1989.

Strickler R.C., Christianson C., Crane J.P. et al. Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril*; 43, 54-61, 1985.

Syrop C.H., Willhoite A., Van Voorhis B.J.: Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. *Fertil Steril* 64:1167-1171, 1995.

Tan S.L., Zaidi J., Campbell S., Doyle P., Collins W.: Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 175: 625-631, 1996.

Tataranni PA. et al. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int j Obes Relat Metab-Disord* 1997, 21(99):818-821.

Tickman D., Arger P., Turek R., Biasco L., Mintz M., Coleman B.: Sonographic assessment of the endometrium in patients undergoing in vitro fertilization. *J Ultrasound Med* 5:197-210, 1986.

Van Blerkom J., Antezak M., Scharader R.: The developmental potential of human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 12: 1047-1055, 1997.

Van Blerkom J.: Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J Assist Reprod Genet* 15: 226-234, 1998.

Van Blerkom J. Can the development competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? *Hum Reprod* 12, 1610-1614, 1997.

Weiner Z. et al.: Assesment of ovarian and uterine blob flow by transvaginal color Doppler in ovarian stimulated woman: correlation with the number of follicles and steroid hormones levels. *Fertil Steril*, 59:743, 1993.

WHO. International statistical classification of diseases and related health problems. X revision Vol 2 Geneva: WHO: 1993.

Woo E.G., Batzer F.R., Go K.J. et al. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfer will improve pregnancy rates in-vitro-fertilization. *Hum. Reprod.* 15;107-112, 2000.

Wooleott R., Stanger J. Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum. Reprod.* 12;963-966, 1997.

Wu H.M., Chiang C.H., Huang H.Y., Chao A.S., Wang H.S., Soong Y.K.: Detection of the subendometrial vascularization flow index by three-dimensional ultrasound may be useful for predicting the pregnancy rate for patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 79, 507-511, 2003.

Yang J.H., Wu M.Y., Chen C.D., Jiang M.C., Ho H.N., Yang Y.S.: Association of endometrial blood flow as determined by a modified colour Doppler technique with subsequent outcome of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14(6): 1606-1610, 1999.

Zaidi J et al. Endometrial thickness, morphology, vascular penetration and velocimetry in predicting implantation in an in vitro fertilization program. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 6(3): 191-198, 1995.

Zaidi J et al. Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in-vitro fertilization program. *Obstet Gynecol*; 88:779-784; 1996.

Zamorano PL. et al. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 1997, 65:223-228.

Zhang X., Chen C.H., Confino E., Barnes R, Milad M., Kazer R.R.: Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 83(2):336-340, 2005.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372; 425-432.

Zollner U., Zollner K.P., Blissing S., Pohls U., Steck T., Dietl J., Muller T.: Impact of three-dimensional measured endometrial volume on the pregnancy rate after intrauterine insemination. *Zentralb Gynakol* 125:136-141, 2003.

Zuchow RJ, Magoffin DA. Direct intra-ovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-1 on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997, 138:847-850.

BIBLIOGRAFIA III LINEA DI RICERCA

Alfirevic Z, Allen-Coward H, Molina F, et al. Targeted therapy for threatened preterm labour based on sonographic measurement of the cervical length: a randomized trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:47-50

Andersen HF et al. Prediction of risk for preterm delivery by ultrasonographic measurement of cervical length. *Am J Obstet Gynecol*, 163: 859, 1990.

Audra P, Mellier G, Faguer B et al. The administration of micronized progesterone in the treatment of threatened premature labor. *Rev Fr Gynecol Obstet*. 1991 Dec; 86(12):751-6.

Berghella V, Tolosa JE, Kuhlman K, et al. Cervical ultrasonography compared with manual examination as a predictor of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 177 (1997)723.

Bibbi JG, Bront J., Mitchell MD., Andersons ABM., Turnbull AC. The effect of cervical cerclage on plasma prostaglandin concentration during early human pregnancy. *British Journal of Obstetric and Gynecology* 86:19-22, 1979.

Bosso O., Baird DD. Infertility and preterm delivery, birthweight and caesarean section: a study within the Danish National Birth Cohort. *Human Reprod*, 2003.

Caritis S. Adverse effects of tocolytic therapy. *BJOG* 2005 Mar;112 Suppl 1:74-8.

Caritis SN, Venkataramanan R, Darby MJ, et al. Pharmacokinetics of ritodrine administered intravenously: Recommendations for changes in the current regimen. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:429.

Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye JE. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and pre-term. *Endocrine Reviews* 21:514-550, 2000.

Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labour. *Obstet Gynecol Surv.* 2000;55:650-660.

Di Renzo GC, Venincasa MD, Bleasdale JE. The identification and characterization of beta-adrenergic receptors in human amnion tissue. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 148:398-405, 1984.

Di Renzo GC, De Domenico P, Iacobelli P, et al. Management della minaccia di parto pretermine. *Ginecologia ed Ostetricia*. Verduci editore 2005.

Dodd JM, Flenady V, Cincotta R, Crwther CA: prenatal administration of progesterone for preventing preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev* 2006 Jan 25;(1):CD004947 .

Egater CH, Husslein P. Biochemistry of myometrial contractility. *Bailliers Clin Obstet Gynecol* 1992 Dec;6(4):755-69.

Elder MG. New perspectives for the effective treatment of preterm labour: an international consensus. *Res Clin Formes* 1994; 16(3): 189-199

Fonseca EB, Celik E. et al Progesterone and risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med* 2007.

Garfield RE, Hayashi RH: Appearance of gap junctions in the myometrium of women during labor. *Am J Obstet Gynecol* 1981, 140:254.

Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, et al. The preterm prediction Study: the value of the new vs standard risk factors in predicting early and spontaneous preterm births. *Am J Public Health* 1998; 88:233-8

Gomez R. et al. Ultrasonographic examination of the uterine cervix is better than cervical digital examination as a predictor of the likelihood of premature delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 171: 956. 1994.

Guzman E.R. et al. Use of cervical ultrasonography in prediction of spontaneous preterm birth in twin gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183: 1103-1107.

Guzman ER, Walter SC, Ananth CV, O'Reilly Green C, Benito CW et al. A comparison of sonographic cervical parameters in predicting spontaneous preterm birth in high-risk singleton gestation. *Ultrasound in Obstetric and Gynecology* 18:204-210, 2001.

Hall MH, Danielian P, Lamont RF. The importance of pre-term birth. In: Elder MG, Lamont RF, Romero R, editors. *Pre-term labour*. New York: Churchill-Livingstone. P 1-28, 1997.

Honest H, Bachmann LM, Coomarasamy A, et al. Accuracy of cervical transvaginal sonography in predicting preterm birth: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003 Sep; 22(3):305-22.

Husslein P. The importance of oxytocin and prostaglandins to the mechanism of labour in humans. *Wein Klin Wochenschr Suppl.* 1984;155:1-32.

Iams JD et al. Cervical competence as a continuum: a study of ultrasonographic cervical length and obstetric performance. *Am J Obstet Gynecol*, 172: 1097, 1995.

Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, et al. The length and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med* 1996 Feb 29; 334(9):595-6.

Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, et al. Cytokines, prostaglandins and parturition - a review. *Placenta* 2003;24 Suppl A: S33-46.

Koudstaal J., Braat D.D., Bruinse H.W., Naaktgeboren N., Vermeiden J.P. and Visser G.H. Obstetric outcome of singleton pregnancies after IVF: a matched control study in four Dutch university hospital. *Hum. Reprod.* 15, 1819-1825. 2000.

Kushnir O, Vigil DA, Izquierdo L e coll: Vaginal ultrasonographic assessment of cervical length changes during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 162: 991, 1990.

Leitch H. et al. Cervical length and dilatation of the internal cervical os detected by vaginal ultrasonographic as markers for preterm delivery: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181: 1465-1472.

Locci M. Lavisio P. et al. Atosiban vs ritodrine used prophylactically with cerclage in ICSI pregnancies to prevent pre-term birth in women identified as being at high risk on the basis of ultrasound scan. *Journal of Obstetrics and Gynecology*, July, 2006, 26(5):396-401.

Maresh M. The obstetric management of preterm labour. *Curr Obstet Gynaecol* 1992; 2: 199-206

Mercer BM, Goldenberg RL, Das A, et al. The preterm prediction study: a clinical risk assessment system. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Jun;174(6):1885-93.

Moutquin JM, Sherman D, Cohen H, et al. Double blind, randomised, controlled trial of atosiban and ritidrine in the treatment of preterm labour: A multicenter effectiveness and safety study. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1191.

Murakawa H et al. Evaluation of threatened preterm delivery by transvaginal ultrasonographic measurement of cervical length. *Obstet Gynecol*, 82: 829, 1993.

Pisaturo M.L., Laviscio P., Locci M. et al. Tecniche di riproduzione assistita e parto pretermine: FIVET e ICSI a confronto. Nostra esperienza. Roma, atti SIGO, 2006.

Royal College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Green Top Guidelines. Tocolytic drugs for women in preterm labour. October 2002.

Saurel-Cubizolles MJ, Zeitlin J, Lelong N, et al. Working conditions and preterm birth: results from the European case-control survey. *J Epidemiol Community health* 2004; 58:395-401.

Sitruk-Ware R, Bricaire C, De Lignieres B et al: Oral micronized progesterone. Bioavailability pharmacokinetics, pharmacological and therapeutic implications—a review. *Contraception*. 1987 Oct;36(4):373-402.

Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *Lancet* 2002;360:1489-97

Sperling L., Kiil C, Larsen U, et al. How to identify twins at low risk of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;26:138-144.

Van Voorhis BJ. Outcomes from assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol.*, 2006 Jan, 107(1):183-200

Varasteh N.N., Neuwirth R.S., Levin B., Keltz M.D. Pregnancy rates after Hysteroscopic Polypectomy and myomectomy in infertile women. *Obstet. Gynecol.* 1999. Aug;94(2):168-71.

Wang J.X., Clark A.M., Kirby C.A. et al. The obstetric outcome of singleton pregnancies following in-vitro fertilization/gamete intra-Fallopian transfer. *Hum. Reprod.*, 9, 141-146. 1994.

Wang J.X., Norman R.J. and Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. *Hum. Reprod.*, 17, 4, 945-949. 2002

Wei Yuan and Andres Lopez B. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2007, 7 (Suppl I):S 10.

Wennerholm UB. et al. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11:1113-1119.

WHO. International statistical classification of diseases and related health problems. X revision Vol 2 Geneva: WHO: 1993.

Worldwide Atosiban versus Beta-Agonists Study Group. Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. *Br J Obstet Gynecol* 2001;108:133.

Yang J.H. et al. Prediction of preterm birth by second trimester cervical sonography in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2000; 15: 288-291.