



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**TROMBOFILIA EREDITARIA E
COMPLICANZE VASCOLARI
DELLA GRAVIDANZA
GEMELLARE MONOCORIALE**

Relatore: Chiar.mo
Prof. S. R. Giannubilo

Tesi di Laurea di:
Giulia Capogrosso

A.A. 2019/2020

INDICE

1. GRAVIDANZA GEMELLARE

1.1- CLASSIFICAZIONE, EPIDEMIOLOGIA ED EZIOPATOGENESI	1
1.2- DIAGNOSI DI GEMELLARITA'	4
1.3- ADATTAMENTI MATERNI.	7
1.4- COMPLICANZE MATERNE.	9
1.5- COMPLICANZE FETALI.	10
1.6- GESTIONE DELLA GRAVIDANZA GEMELLARE.	21
1.7- ESPLETAMENTO DEL PARTO.	22

2. TROMBOFILIA.

2.1- STATO TROMBOFILICO FISIOLÓGICO DELLA GRAVIDANZA.	25
2.2- STATO TROMBOFILICO NON FISIOLÓGICO IN GRAVIDANZA.	28
2.2a- Stati di trombofilia ereditaria.	28
2.2b- Stati di trombofilia acquisita.	34
2.3- SCREENING DELLA TROMBOFILIA.	45

3. STUDIO presso SOD clinica di Ostetricia e Ginecologia a prevalente indirizzo ostetrico e gravidanza ad alto rischio Ancona UNIVPM

3.1- INTRODUZIONE.	48
3.2- PAZIENTI E METODI.	49
3.3- RISULTATI.	51
3.4- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.	53

4. BIBLIOGRAFIA.

55

1. GRAVIDANZA GEMELLARE

1.1 CLASSIFICAZIONE, EPIDEMIOLOGIA ED EZIOPATOGENESI DELLA GRAVIDANZA GEMELLARE

Si definisce gravidanza multipla una gravidanza in cui si sviluppano contemporaneamente due o più embrioni. Nella specie umana la riproduzione è normalmente unipara e la gravidanza multipla è pertanto considerata un'eccezione, che si verifica con la frequenza di circa 1:80 parti [1] e tale frequenza si riduce in maniera esponenziale all'aumentare del numero di feti.

È verosimile tuttavia che un numero imprecisato di gravidanze multiple esiti in aborto, anche molto precoce, e non venga pertanto nemmeno diagnosticato. In altri casi invece, gravidanze inizialmente multiple si concludono con la nascita di uno solo dei gemelli (fenomeno del vanishing twin).

Oggi le gravidanze gemellari rappresentano l'1-2% di tutte le gravidanze [2-3], anche se negli ultimi anni si è assistito ad un aumento dell'incidenza dovuto in parte all'aumento dell'età media delle gestanti, e in parte al sempre più frequente ricorso a terapie farmacologiche di stimolazione ovarica e a tecniche di fecondazione assistita.

Si definiscono **gemelli monozigoti** o identici i feti che derivano da un unico zigote, un ovocita fecondato da un solo spermatozoo che nei primi 15 giorni di vita si divide in due abbozzi embrionali distinti che condividono un identico patrimonio genetico.

L'evento della divisione dello zigote in due parti è casuale, non legato a familiarità e a seconda del momento in cui si verifica si possono creare diverse situazioni: (Fig.1)

- La divisione che avviene fra il 1° e il 3° giorno dalla fecondazione dà origine a due embrioni che si impiantano separatamente e si parla di gravidanza gemellare **bicoriale biamniotica** (BB), ovvero con due placenti e due sacchi amniotici. Questa situazione rappresenta 1/3 dei casi di gravidanza monozigote.
- La divisione che avviene fra il 4° e l'8° giorno dalla fecondazione, ovvero a seguito della differenziazione del trofoblasto placentare, genera una gravidanza **monocoriale biamniotica** (MB), cioè con una sola placenta e due sacchi amniotici; questo avviene nei 2/3 delle gravidanze monozigoti.

- Se la divisione avviene tra il 9° e il 12° giorno dal concepimento, la gravidanza sarà caratterizzata da una placenta unica con un singolo sacco amniotico per entrambi i feti; si parla di gravidanza **monocoriale monoamniotica** (MM). Questo avviene solo nell'1% dei casi.
- Se la duplicazione avviene oltre il 12° giorno le cellule fetali sono parzialmente differenziate e si genera una gravidanza monocoriale monoamniotica con **gemelli congiunti** (altrimenti detti “siamesi”); è un evento molto raro, avviene circa in 1 su 100000 parti. Esistono vari tipi di gemelli congiunti, a seconda del punto di unione: toraco-onfalopaghi se l'unione è a livello del torace e della parete addominale anteriore; ischiopaghi se l'unione è a livello anteriore del bacino; pigopaghi se a livello del sacro, craniopaghi se l'unione è a livello del cranio e parapaghi se la fusione è laterale. La prognosi dipende dalle strutture in comune. Se vi è condivisione di strutture vitali, come ad esempio il cuore, la prognosi è infausta. Se invece vi è una minima condivisione di tessuti e organi, la prognosi può essere favorevole.

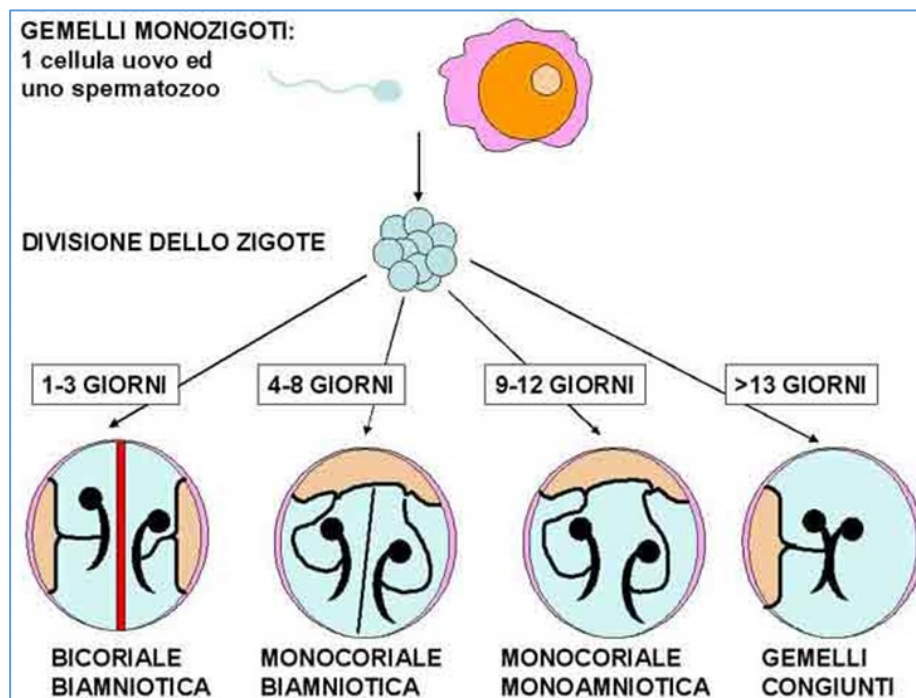


Fig. 1 – Gemelli monozigoti

Si definiscono **gemelli dizigoti** (o “falsi gemelli”) quelli che originano da due ovociti, maturati nel corso dello stesso ciclo mestruale, fecondati da spermatozoi differenti.

Questi gemelli non condividono lo stesso patrimonio genetico, pertanto potranno essere di sesso diverso e sono assimilabili a comuni fratelli. Gli zigoti multipli si impiantano separatamente nella parete uterina determinando una gravidanza bicoriale, ovvero con placentate separate (anche se possono essere contigue) e circolazioni fetali indipendenti fra loro.

La gemellarità dizigote è conseguenza di una poliovulazione, la cui frequenza è correlata all'aumentare dell'età materna, alla familiarità (relativa alla linea materna), oppure può essere dovuta a cause iatrogene come la somministrazione farmaci per la stimolazione ovarica.

1.2 DIAGNOSI DI GEMELLARITÀ

La gravidanza multipla è considerata ad alto rischio e l'entità del rischio aumenta nelle monozigotiche rispetto alle polizigotiche, nelle monocoriali rispetto alle bicoriali, nelle monoamniotiche rispetto alle biamniotiche. L'entità del rischio può essere ridotta dal momento in cui si riesca a fare diagnosi precoce non solo di gravidanza multipla, ma soprattutto di corionicità, zigosità e amnioticità. Pertanto, è essenziale l'impiego di imaging ultrasonografico transvaginale e transaddominale.

La gravidanza multipla pluricoriale può essere diagnosticata già dopo 4 settimane di amenorrea grazie all'individuazione ecografica di due o più camere gestazionali. È necessario attendere le 7-8 settimane per la diagnosi di amnioticità.

Nella pratica clinica, la determinazione certa di amnioticità e corionicità viene effettuata ecograficamente non prima delle 7-9 settimane e non oltre le 11-12 settimane, grazie al riconoscimento di markers specifici quali il *numero delle placente*, il *numero delle membrane amniocoriali*, lo *spessore del setto interamniotico* e la rilevazione del “*segno lambda*”(Fig. 2), ovvero la duplicazione dei foglietti coriali nel punto di inserzione placentare (diagnosi di gravidanza bicoriale), o del “*segno T*” (Fig. 3), ovvero la sezione ecografica della congiunzione ad angolo retto delle due membrane amniotiche con il corion (diagnosi di gravidanza monocoriale). [4]



Fig. 2 - Segno lambda, gravidanza bicoriale



Fig. 3 – Segno T, gravidanza monocoriale

Quindi la valutazione di corionicità e amnioticità è eseguita con maggiore precisione e attendibilità entro le 14+0 settimane di gestazione (SE 90% SP 99%).

Il periodo migliore è tra le 11+0 e 13+6 settimane, quando il CRL (crown-rump lenght) misura 45-84 millimetri.

I criteri per la diagnosi di corionicità sono: [4]

- **Numero di masse placentari**, anche se occasionalmente sono state riportate gravidanze con TTTS (twin to twin transfusion syndrome) e placente apparentemente separate.
- **Segno lambda o segno T** a livello dell'inserzione delle membrane sulla placenta; il segno lambda da solo non è sufficientemente accurato, vanno valutati anche gli altri criteri, anche perché scompare nel 7% delle gravidanze bicoriali tra la 16° e la 20° settimana.
- **Spessore della membrana tra i feti**:
 - Se >2 mm individua una gravidanza bicoriale con 95% di VPP;
 - Se <2 mm individua una gravidanza monocoriale con 90% di VPP.

Dopo la 14° settimana, la diagnosi di corionicità deve comprendere tutti i criteri precedenti più la concordanza dei sessi. Infatti, dalle 16 settimane iniziano ad essere visibili i genitali esterni, consentendo così la diagnosi di zigosità.

Il sesso discordante dei gemelli, permetterà la diagnosi di gravidanza dizigote, mentre la monozigosità può essere determinata solo nel caso in cui si è sicuri che la gravidanza sia monocoriale e si individuano sessi concordanti.

Prima della 10° settimana la corionicità viene valutata in base a diversi criteri (preferire la valutazione T/V rispetto alla T/A):

- N. camere gestazionali e n. di embrioni con attività cardiaca;
- N. sacchi amniotici nella cavità corionica; infatti prima della 10° settimana i sacchi amniotici non sono abbastanza grandi da formare il setto inter-twin;
- N. sacchi vitellini: se sono due la gravidanza è biamniotica ma se è uno occorre un follow up per assegnare definitivamente la corionicità.

Se non è possibile fare diagnosi di corionicità, è meglio gestire la gravidanza come se fosse monooriale e inviare la paziente presso un centro di riferimento possibilmente entro la 14+0 settimana di gestazione [2].

1.3 ADATTAMENTI MATERNI ALLA GRAVIDANZA GEMELLARE

L'**aumento di peso corporeo** durante una gravidanza gemellare è maggiore rispetto alla gravidanza singola; l'incremento ponderale si colloca maggiormente nel primo e nell'ultimo periodo della gestazione, a differenza delle gravidanze singole in cui l'incremento massimale avviene durante la fase intermedia.

L'aumento di peso raccomandato dalle Linee Guida IOM nelle gravidanze gemellari si basa sull'indice di massa corporea (BMI) in pre-gravidanza: è di 16.8-24,5 kg per le donne normopeso, 14.1-22.7 kg per le donne sovrappeso e 11.3-19.1 kg per quelle obese. [35] Per una donna normopeso, l'introito calorico giornaliero dovrebbe essere di 3000-3500 calorie.

Un aumento di peso non adeguato nelle prime 24 settimane si associa ad un rischio aumentato di un neonato piccolo per età gestazionale alla nascita (SGA – *small for gestational age*) [2]. Per questo motivo, una sana ed adeguata alimentazione, insieme all'adozione di un intervento nutrizionale specifico per la gravidanza multipla, contribuiscono al buon esito della gravidanza.

Nella gravidanza multipla si riscontra inoltre un aumento della produzione di **ormoni placentari**, determinato soprattutto dall'aumento della massa placentare stessa. L'incremento di progesterone, estriolo, β HCG e dell'ormone lattogeno placentare, necessita di curve di riferimento specifiche che non sono assimilabili a quelle di una gravidanza singola.

Affaticamento, tensione del seno, cambiamenti dell'umore, sonnolenza, nausea e aumento dell'appetito sono più accentuati; la nausea potrà protrarsi più a lungo rispetto alla gravidanza singola a causa dei più elevati livelli ormonali.

Possono comparire macchie ipercromiche sul viso (melasma gravidico) e le areole mammarie possono scurirsi e aumentare di diametro.

Dal punto di vista emodinamico, tra le 16 e le 18 settimane si possono riscontrare cali pressori dovuti alla vasodilatazione e l'**anemia fisiologica da emodiluizione** è accentuata nella gravidanza gemellare. Particolare attenzione va posta ad un aumento di peso improvviso (2 kg/15 giorni), che può indicare ritenzione idrica correlata ad ipertensione, e all'improvviso aumento delle dimensioni addominali che può nascondere un polioidramnios.

Il volume complessivo intrauterino, che all'inizio del 2° trimestre è analogo a quello di una gravidanza singola, già dalla 18° settimana di gestazione diventa almeno il doppio nella gravidanza bigemina, circa 10.000 ml rispetto ai 5.000 ml, tanto che al 6° mese la crescita dell'utero corrisponde a quella del 9° mese di una gravidanza singola. Per questo motivo la donna può manifestare minaccia di parto pretermine (MPP).

L'addome risulta essere quindi più pronunciato, così come le alterazioni del senso del gusto e la ritenzione idrica.

Durante il secondo trimestre iniziano i disturbi da ingombro: dispnea, compressione sull'apparato gastroenterico, con difficoltà digestive e stipsi, e ristagno venoso periferico, con formazione di varici del plesso emorroidario e del circolo venoso superficiale degli arti inferiori. Infine, durante il terzo trimestre, l'andatura della donna è resa più difficoltosa dal maggior contenuto uterino, e la paziente potrà riferire un aumentato senso di affaticamento con riduzione della capacità di svolgimento di attività fisiche anche lievi, e disturbi del sonno.

1.4 COMPLICANZE MATERNE

Tra le complicanze materne di una gravidanza multipla si ricordano:

- *Disordini ipertensivi*; l'aumentato rischio di preeclampsia e di ipertensione nella gravidanza multipla potrebbe essere correlato al numero di feti ed è più frequente nelle gravidanze gemellari monozigotiche [5-6-7].
- *Anemia*, per aumentato fabbisogno di ferro (11%).
- *Diabete gestazionale*; la gravidanza gemellare ne rappresenta un fattore di rischio insieme a fattori ambientali, dietetici e genetici. [9-10-11-12]
- *Nausea, vomito e disturbi da ingombro* (dispnea, dispepsia, stipsi, varici agli arti inferiori e del plesso emorroidario).
- *Infezioni delle vie urinarie*, rischio aumentato rispetto alle gravidanze singole.
- *Poliidramnios* (4%).
- *Placenta previa*, il rischio è aumentato rispetto alle gravidanze singole; inoltre una placentazione anomala potrebbe determinare complicazioni materne e fetali più severe in una gravidanza gemellare rispetto ad una singola.
- *Parto pretermine*; il tasso di parto pretermine nella gravidanza gemellare è rispettivamente del 7% prima delle 32 settimane, del 13% prima delle 34 settimane, e del 41% prima delle 37 settimane [2]; di questi una quota è iatrogena, a seguito dell'insorgere di complicanze fetali o materne, ma nel restante 70% dei casi il parto è spontaneo. Una delle cause di parto pretermine nelle gravidanze multiple è la sovradistensione uterina legata al sovraffollamento del viscere, che può scatenare un inizio prematuro delle contrazioni: l'epoca gestazionale media al parto infatti diminuisce all'aumentare del numero di feti [2]. Altre cause favorevoli possono essere la maggiore distensione interamniotica, un poliidramnios, infezioni, l'incontinenza cervicale o la rottura prematura delle membrane (PROM), tutte condizioni più frequenti in una gravidanza multipla [2-10-12].
- *Distacco prematuro di placenta* (2%); quest'ultimo è correlato alla sovradistensione uterina e alla brusca decompressione che segue una rottura prematura delle membrane (PROM).
- *Emorragia post-partum*; più frequente che in una gravidanza singola a causa della maggiore superficie di inserzione placentare sulla decidua, della tendenza all'atonia miometriale e della sovradistensione uterina.
- *Endometrite post-partum*, anch'essa correlata alla maggiore superficie di inserzione placentare.

- *Aumento della mortalità materna*, è triplicato nella bigemina rispetto alla gravida con feto singolo, indipendentemente dall'età, dalla razza, dalla situazione coniugale o dal titolo di studio. [8-9-10]

1.5 COMPLICANZE FETALI

I feti gemelli possono andare incontro, con frequenza maggiore rispetto ai feti singoli, a diverse complicanze:

- *Crescita fetale discordante*; la crescita intrauterina può essere differente tra i due gemelli. Le misurazioni più comunemente usate per valutare la crescita fetale sono la circonferenza cranica (CC), la circonferenza addominale (CA), il rapporto fra queste (CC/CA) e la lunghezza del femore (LF); il presupposto fondamentale per la valutazione dell'accrescimento è la conoscenza dell'età gestazionale e il parametro che fornisce la datazione più accurata della gravidanza è la lunghezza vertice-sacro (CRL), valutata entro l'11° settimana. La crescita dei gemelli non è significativamente diversa da quella dei feti delle gravidanze singole per cui si possono utilizzare le stesse curve di crescita. Minime variazioni possono essere considerate fisiologiche, mentre una evidente discordanza di peso tra i gemelli rappresenta un fattore di rischio per maggior incidenza di IUGR, malformazioni fetali, morte intrauterina di un gemello, parto pretermine, TTTS (se sono gemelli monocoriali).
- *Ritardo di crescita intrauterino (IUGR, Intra Uterine Growth Restriction)*; il ritardo di crescita intrauterino è un andamento di crescita inferiore rispetto alla potenziale capacità di crescita del feto, ed è definito da un peso stimato inferiore al 10° percentile rispetto a quello atteso per epoca gestazionale. Lo IUGR è definito "severo" quando la sua determinazione biometrica cade sotto il 3° percentile e "lieve" quando è compreso tra il 3° e il 10° percentile. [17]

Può essere il risultato di diverse alterazioni fetali, materne, uterine o placentari e altri fattori di rischio sono anche il fumo di sigaretta, la malnutrizione materna e le patologie vascolari materne.

Costituisce una delle maggiori preoccupazioni nel management della gravidanza per l'elevata morbilità fetale (distress respiratorio, aspirazione da meconio, crisi ipoglicemiche, emorragia intraventricolare, enterocolite necrotizzante, difficoltà a mantenere la temperatura corporea, scarsa resistenza alle infezioni, policitemia, difficoltà di sviluppo psico-fisico regolare) e mortalità ad essa associate.

Allo IUGR si associa un rischio di mortalità perinatale da 4 a 8 volte superiore a quello della popolazione normale, mentre circa la metà dei neonati che sopravvivono hanno sequele a breve o a lungo termine. Gli esiti a lungo termine contemplano un aumentato rischio di alterazione dello sviluppo neurologico e ritardi di crescita. Inoltre, il 20% circa dei feti affetti presentano anche malformazioni congenite o anomalie cromosomiche.

In conclusione, i neonati con IUGR presentano un rischio più alto di esiti avversi sia nel breve che nel lungo termine rispetto ai neonati di peso normale per l'epoca gestazionale. [17]

Ne esistono due differenti tipi: (Fig. 4)

- IUGR *asimmetrico*, più frequente, si verifica durante l'ultima parte della gravidanza; è caratterizzato da una marcata riduzione della sola circonferenza addominale perché il feto è sottopeso e dirige la maggior parte della sua energia a mantenere la crescita di organi vitali, come il cervello e il cuore, a discapito del fegato, del tessuto muscolare e del grasso. Presenta una biometria cranica normale per l'epoca gestazionale, ma sproporzionatamente grande ("head sparing") rispetto ad altri parametri come la circonferenza addominale ridotta (a causa della ridotta dimensione del fegato), arti sottili (a causa della diminuzione della massa muscolare) e uno scarso pannicolo adiposo con cute sottile.

Se l'insulto che causa la restrizione asimmetrica della crescita è sostenuto abbastanza a lungo o è abbastanza grave, il feto può perdere la capacità di compensare e la restrizione di crescita interesserà tutti gli organi, anche il cervello ed il cranio con gravissime conseguenze per il feto. Lo IUGR asimmetrico si manifesta dopo la 26esima settimana, è ingravescente con il progredire delle settimane ed è dovuto ad **insufficienza placentare**, secondaria a patologie materne (ipertensione arteriosa, cardiopatie, diabete, trombofilia, talassemia, eccetera).

In caso di IUGR asimmetrico si osserva un aumento dell'indice di resistenza (IR) e una diminuzione della velocità di flusso nei distretti splanchnici e muscolari; il contrario avviene nei distretti encefalici, cardiaci e surrenalici. [17]

- IUGR *simmetrico*, caratterizzato invece da un ritmo di crescita costantemente subottimale in cui tutti i parametri biometrici (circonferenza addominale, circonferenza del cranio, lunghezza del femore) sono ridotti; perciò il feto è proporzionatamente piccolo. È associato a **patologie congenite** (malformazioni o alterazioni genetiche come trisomia 13, 18 e 21), **gravidanze gemellari** o multiple, o ad **infezioni** contratte in epoca precoce di gravidanza (ToRCH: Toxoplasma gondii, virus della Rosolia, Citomegalovirus e Herpes simplex), sindrome da anticorpi antifosfolipidi, fenilchetonuria, abuso di alcool, fumo, droghe, scarsa

alimentazione, condizioni economiche disagiate. Avviene quindi precocemente durante la gravidanza. Le sequele post-natali possono essere molto serie specialmente a carico del SNC. [17]



Fig. 4-IUGR

Nelle gravidanze gemellari si può riscontrare anche il ritardo di crescita selettivo (*sIUGR*), che si caratterizza per una differenza di peso fra i due gemelli maggiore del 25% o per una differenza fra le misure della circonferenza addominale maggiore del 10%, in assenza di altre complicanze. [10-11]

$$\frac{\text{EFW del gemello grande} - \text{EFW del gemello piccolo}}{\text{EFW del gemello grande}} \times 100 \%$$

EFW= estimated fetal weight

La deviazione dal normale pattern di crescita può essere considerata tale se viene rilevata in due misurazioni consecutive a distanza di almeno due settimane.

In presenza di *sIUGR* è necessario un monitoraggio più stretto ed individualizzato del feto IUGR tramite flussimetria doppler dell'arteria ombelicale [2-4-13]. Per predire un eventuale sviluppo di IUGR è possibile valutare lo stato della placentazione tramite la flussimetria doppler delle arterie uterine a 22-24 settimane: in caso di insufficienza placentare si noterà una marcata differenza fra flusso diastolico e sistolico e l'eventuale presenza del cosiddetto *notch diastolico*, ovvero un'incisura del flusso riscontrabile all'inizio della fase diastolica. (Fig. 5)

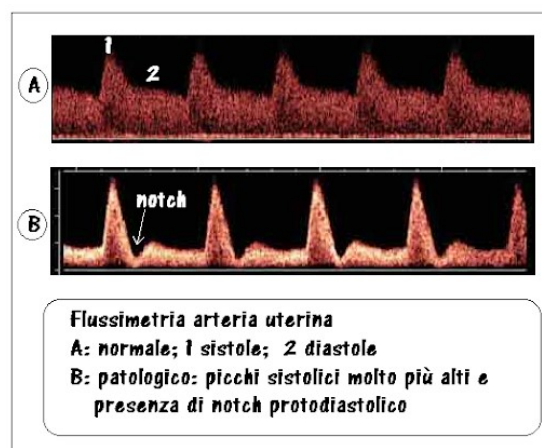


Fig. 5-Notch diastolico

- *Morte fetale intrauterina*; La morte in utero di uno dei gemelli avviene nel 2-5% delle gravidanze bigemine nel I e II trimestre, con aumento della percentuale nelle gravidanze multiple [11-12-15-34]. La frequenza è 3-4 volte più elevata nel caso di gemelli monocoriali rispetto ai bicoriali [11-12-13-14]; i gemelli monocoriali infatti condividono la circolazione placentare e l'eventuale morte intrauterina di uno dei due comporta un abbondante sequestro ematico nel suo territorio placentare, a cui può conseguire un'emorragia acuta nel gemello restante[18]; inoltre necrotossine possono passare attraverso gli shunt placentari dal feto morto a quello vivo determinando lesioni ischemiche a vari organi e apparati. Si stima che almeno il 12% dei gemelli monocoriali superstiti alla morte del gemello vada incontro a danni neurologici e sistemici di varia gravità [8-10-11] tra cui: idrocefalia, idranencefalia, microcefalia, necrosi cerebellare, infarto cerebrale, encefalomalacia multicistica, quadriplegia spastica, infarto splenico, intestinale o epatico, atresia intestinale, necrosi renale e polmonare. L'espletamento del parto non sembra ridurre questo rischio.

L'atteggiamento più appropriato in caso di morte di un feto in una gravidanza monocoriale è quello conservativo, con ecografia cerebrale ogni 4 settimane, poiché le manifestazioni del danno neurologico sono varie e possono comparire fino a 4 settimane dopo. È raccomandata la Risonanza Magnetica fetale per tale valutazione.

Nei gemelli bicoriali invece, grazie all'autonomia delle placenti, le complicanze del gemello superstite sono più rare e permettono di proseguire la gravidanza fino al raggiungimento dello sviluppo polmonare; tuttavia, se la morte intrauterina fetale avviene oltre la 37^o settimana, è raccomandato l'espletamento del parto.

Indipendentemente dalla corionicità, in caso di morte di un gemello soprattutto nel III trimestre, la madre dovrebbe essere controllata periodicamente per la possibile comparsa di coagulopatia.

- *Vanishing twin syndrome* o sindrome del gemello scomparso o evanescente; è il risultato dell'aborto durante il primo trimestre di uno dei feti presenti in utero, nel quale il tessuto fetale viene totalmente o parzialmente riassorbito dai feti rimasti, dalla placenta o dalla madre. Questa sindrome è associata ad un aumento del rischio di sviluppo di malformazioni nel feto rimanente, quali anomalie dello sviluppo cerebrale, difetti di sviluppo cardiaco, renale, epatico, cutaneo, polmonare e intestinale, fino alla morte intrauterina. Se uno dei due gemelli va incontro a morte durante il secondo trimestre e la gravidanza procede fino al termine, si reperirà un *feto papiraceo*; se invece la gravidanza si interrompe subito dopo il decesso, il gemello morto presenterà segni di macerazione più o meno spiccata.
- *Malformazioni congenite*; La gravidanza multipla è associata ad un aumento del rischio di anomalie congenite rispetto alla gravidanza singola [20-10-15]; in particolare i gemelli monozigoti hanno un rischio doppio di anomalie rispetto ai dizigoti, la cui prevalenza è simile a quella dei feti singoli (2-3%) [21]. Una malformazione può interessare entrambi i gemelli solo nel 15% dei casi anche se, nel caso in cui solo uno ne sia affetto, la probabilità di esito sfavorevole nel gemello sano è aumentata. Le malformazioni più comuni sono quelle di natura cardiaca oltre alle quali sono riscontrabili: difetti di sviluppo del tubo neurale, atresia anale ed esofagea, malformazioni renali [2-20-15-16].

Esistono poi 3 tipi di malformazioni specifiche delle gravidanze multiple:

- Difetti della midline, che si verificano nei gemelli congiunti;
- Malformazioni da eventi vascolari dovuti ad anastomosi placentari (es. dopo morte di un feto): microcefalia, leucomalacia periventricolare, idrocefalo, atresia intestinale, displasia renale, amputazione di arti;
- Malformazioni da affollamento: asimmetria del cranio, anomali dei piedi, lussazione.

Lo screening per le anomalie strutturali va offerto come di routine, ma le ecografie vanno eseguite leggermente dopo la tempistica prevista per le gravidanze singole.

Per le gravidanze monooriali è indicata l'ecocardiografia fetale per individuare modificazioni ecocardiografiche significative, come la cardiomegalia, il rigurgito tricuspide, l'aumento dello spessore del miocardio, che sono frequenti nei casi di TTTS.

In caso di anomalie di un feto, il feticidio selettivo non può essere eseguito utilizzando il potassio intracardiaco, ma si preferisce la coagulazione bipolare del cordone ombelicale del feto o la laser-ablazione intrafetale.

In assenza di evidenze cliniche su quale delle procedure utilizzabili dia risultati migliori, la scelta della metodica è responsabilità del centro che esegue la procedura.

- *Anomalie cromosomiche*; Le gravidanze multifetali hanno un rischio aumentato di anomalie morfologiche e aneuploidie.

Infatti, in una gravidanza gemellare di una paziente di 33 anni la probabilità che uno dei due gemelli abbia la sindrome di Down è pari a quella di una donna di 35 anni con una gravidanza singola [19].

I gemelli dizigoti derivano dalla fecondazione di due ovociti: ciascun feto ha quindi il suo rischio specifico di anomalia cromosomica; per tale motivazione, il rischio complessivo per la singola paziente raddoppia. Viceversa, i gemelli monozigoti derivano dalla fecondazione di un unico ovocita e successiva divisione dello zigote; pertanto teoricamente, i gemelli monocoriali dovrebbero avere lo stesso rischio di aneuploidia, anche se non mancano le eccezioni.

I quadri possibili sono tre:

1. Gemelli dizigoti con un feto malato;
2. Gemelli dizigoti entrambi malati;
3. Gemelli omozigoti entrambi malati.

Il counseling relativo ai test di screening e ai test diagnostici per le aneuploidie è notevolmente complesso a causa di alcuni fattori peculiari della gemellarità quali la zigosità e la corionicità, l'abilità tecnica dell'operatore, la fattibilità del prelievo, le modalità con cui la gravidanza è stata ottenuta (PMA) e le possibili implicazioni in caso di riscontro di un'anomalia cromosomica a carico di uno dei gemelli.

Lo screening combinato del I trimestre, misurazione della translucenza nucale e dosaggio biochimico di PAPP-A (Pregnancy-associated Plasma Protein-A) e free-beta-HCG (Human Chorionic Gonadotropin) nel sangue materno, ha nella gravidanza gemellare una performance inferiore rispetto alla gravidanza singola, ma è comunque efficace. Le procedure diagnostiche invasive nelle gravidanze multiple presentano problematiche aggiuntive rispetto a quanto previsto per la gravidanza singola.

Per quanto riguarda il prelievo dei villi coriali, la tecnica utilizzata è identica a quella impiegata nella gravidanza singola, utilizzando la via transaddominale in quanto gravata da minori complicanze rispetto a quella transcervicale.

Nel prelievo del liquido amniotico, la tecnica più diffusa prevede due inserzioni differenziate con due diversi aghi, eseguendo la seconda procedura ad una distanza elevata dalla prima, dopo

aver identificato in modo chiaro il setto interamniotico. In caso di non chiara visualizzazione del setto, l'introduzione di una piccola quantità di colorante (2-3 ml di indaco carminio) nel primo sacco dopo il prelievo del liquido amniotico, permette di avere una maggiore sicurezza nel non campionare due volte lo stesso sacco.

- *Prematurità*; I gemelli tendono a nascere mediamente con almeno 4 settimane di anticipo rispetto ai neonati di gravidanze singole, con un peso inferiore di almeno 500 grammi. La maggiore distensione della muscolatura uterina, infatti, favorisce il parto pretermine e la gravidanza multipla può inoltre complicarsi con tossemie o distacco intempestivo di placenta, che comportano un rischio aumentato di anomalie congenite e immaturità d'organo fetale [33].

Vi sono poi complicanze che riguardano in modo specifico i *gemelli monocoriali* dal momento che essi, condividendo la circolazione placentare, possono presentare delle anastomosi placentari di tipo artero-arterioso, veno-venoso e artero-venoso, che possono essere profonde o superficiali; le anastomosi artero-venose hanno un unico flusso monodirezionale da un gemello all'altro, mentre le veno-venose e artero-arteriose consentono un flusso bidirezionale.

- *Sindrome da trasfusione fetto-fetale (Twin to Twin Transfusion Syndrome)*; la TTTS si verifica nel caso in cui la corrente ematica delle anastomosi decorra in misura quantitativamente maggiore da un gemello verso l'altro, a causa della minor presenza di anastomosi bidirezionali rispetto a quelle unidirezionali (Fig. 6). È un'evenienza che riguarda il 9-15% delle gravidanze monocoriali, ma che si rivela potenzialmente letale se non riconosciuta e non trattata, in quanto nel 60-90% dei casi esita in morte fetto-neonatale o in disabilità. [12-13-15] Interessa più frequentemente le gravidanze bigemine monocoriali biamniotiche rispetto alle monocoriali monoamniotiche, probabilmente per la maggiore presenza in queste ultime di anastomosi artero-arteriose protettive.

Il feto che riceve più sangue, detto “**ricevente**”, va incontro ad un sovraccarico di liquidi con conseguente maggior produzione di urina e di liquido amniotico (poliidramnios). Diventa ipervolemico, policitemico ed iperteso, con conseguente ipertrofia miocardica e scompenso cardiaco.

Il feto che riceve meno sangue, invece, è detto “**donatore**” e sarà anemico, ipoteso e ipovolemico (predisposizione a IUGR), produrrà meno urina e liquido amniotico, con conseguente oligoidramnios.

L'oligoidramnios può essere talmente severo da non permettere la visualizzazione delle membrane amniotiche, strettamente adese al feto donatore, determinando il quadro sonografico dello "stuck twin" o gemello bloccato (che tuttavia non è un fenomeno esclusivo della TTTS).

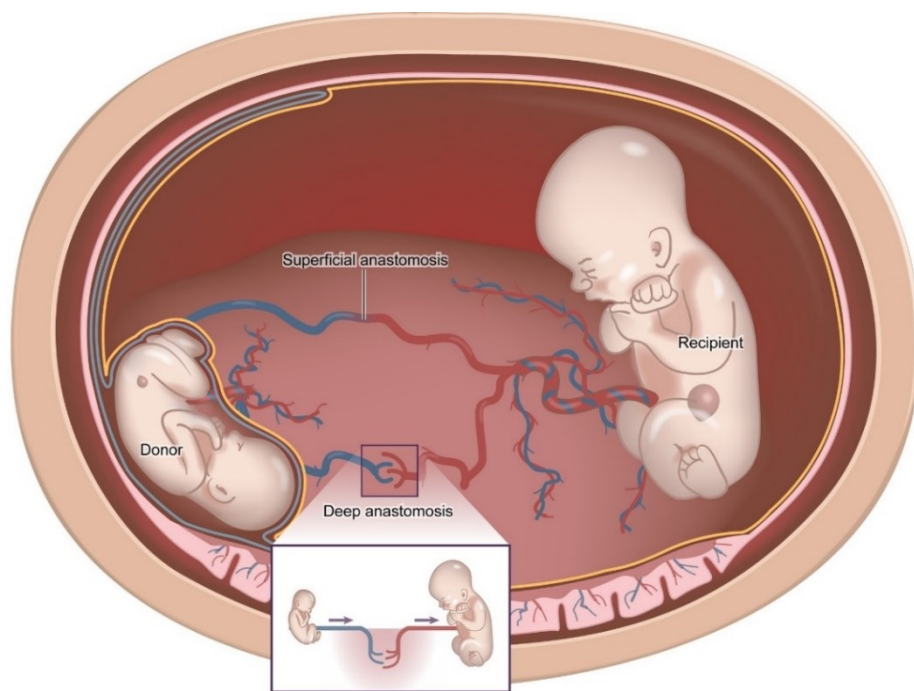


Fig. 6– Sindrome da trasfusione fetto-fetale

Nel 5% dei casi, la TTTS può invertirsi, cioè il gemello donatore diventa ricevente e viceversa. La ragione di tale inversione non è stata chiarita, ma può accadere anche a seguito di terapia laser.

L'evidenza ecografica durante il 2° trimestre di una sola placenta e due sacchi amniotici, uno con oligoidramnios e l'altro con polioidramnios, il riempimento vescicale discordante e, nei casi più severi, segni di disfunzione emodinamica fetale, permettono di fare diagnosi prenatale di TTTS, seguendo la classificazione di Quintero (Fig. 7) per definirne la gravità; la discrepanza di crescita non rientra nei criteri diagnostici, essendo presente solo nella metà dei casi.

La classificazione secondo Quintero può avere significato prognostico, tuttavia il decorso della condizione clinica è imprevedibile e può evolvere in un miglioramento o in un rapido declino.

STADIO	ANOMALIA RISCONTRATA
1	Sequenza oligoidramnios-polidramnios. Vescica donatore visibile. Doppler normale in entrambi i gemelli.
2	Sequenza oligoidramnios-polidramnios. Vescica del donatore non visualizzabile. Doppler normale in entrambi i gemelli.
3	Sequenza oligoidramnios-polidramnios. Vescica del donatore non visualizzabile. Doppler anormale per entrambi i gemelli: nell'arteria ombelicale inversione o assenza di flusso in diastole, onda del dotto venoso con flusso inverso o flusso pulsatile nella vena ombelicale.
4	Idrope di uno o entrambi i gemelli
5	Morte intrauterina di uno o entrambi i feti

Fig. 7 – Classificazione di Quintero

La TTTS può essere classificata in forma acuta e cronica; la TTTS **cronica** si instaura in maniera lentamente progressiva e si manifesta nelle fasi precoci della gravidanza (12-26 settimane di gestazione) ed è più grave dal momento che i feti sono ancora in una fase iniziale dello sviluppo e devono passare ancora molto tempo in utero.

La TTTS **acuta peripartum** si manifesta improvvisamente al momento del parto, perché le contrazioni uterine e la modificazione della posizione fetale determinano differenze pressorie nelle anastomosi e conseguente trasfusione acuta da gemello a gemello. La diagnosi si basa su segni di shock ipovolemico emorragico, reticolociti normali, assenza di sequenza oligo-polidramnios, differenza di Hb > 5 g/dl tra i gemelli, ampie anastomosi AA-VV all'esame istologico della placenta.

La TTTS **acuta perimortem** invece si instaura durante il terzo trimestre o precocemente durante il primo trimestre, poco prima o al momento della morte in utero di un gemello. È dovuta ad una ex-sanguino trasfusione acuta causata da anastomosi artero-arteriose o vena venose.

Le opzioni terapeutiche della TTTS includono la condotta d'attesa (in epoca gestazionale avanzata o negli stadi precoci), l'ablazione laser delle anastomosi in fetoscopia (trattamento di

scelta fra le 16 e le 26 settimane di gestazione), l'amnioriduzione, ossia il drenaggio di liquido amniotico dal sacco del feto che presenta polidramnios (negli stadi precoci o successivamente alla 26° settimana), settostomia e riduzione selettiva mediante coagulazione del cordone [22].

Una tipologia particolare di trasfusione da gemello a gemello in gravidanze monocoriali è la **Twin Anemia-Polycythemia Sequence (TAPS)**. È dovuta alla presenza di piccole anastomosi artero-venose unidirezionali, che determinano una cronica e lenta trasfusione di sangue dal feto donatore al ricevente. Di conseguenza, il feto donatore svilupperà gradualmente una anemia, mentre il ricevente una policitemia, in assenza di oligo-poliidramnios. [36]

Può essere ad insorgenza spontanea nel 3-5% dei casi o iatrogena, dopo laser terapia nel 13% (l'ex ricevente in genere diventa anemico). Va in diagnosi differenziale con: TTS acuta perinatale, TTS cronica, TTS cronica con TAPS, cause di anemia cronica (distacco di placenta, infezione, emorragia feto-materna cronica) e cause di policitemia cronica (ipossia cronica da IUGR). [11-15]

La diagnosi viene posta in epoca prenatale se:

- Vps MCA (velocità di picco sistolico in arteria cerebrale media) >1.5 MoM in un feto e <0.8 MoM nell'altro;
- Assenza di sequenza oligo-poliidramnios.

Oppure in epoca postnatale se:

- Hb<11 g/dl, Hb>20 g/dl o differenza di Hb>8 g/dl tra i 2 gemelli;
- Non segni di shock ipovolemico;
- Aumento di reticolociti >95° pc o ampio inter-twin ratio >17;
- Trombocitopenia;
- Piccole anastomosi AV all'esame istologico della placenta.

Ad oggi non sembra essere associata ad aumento della mortalità e morbilità perinatale.

- *Sequenza TRAP (Twin Reverse Arterial Perfusion) e acardia*; la sequenza TRAP è una rara complicanza delle gravidanze monocoriali (1%) ed è rappresentata dalla presenza di un feto acardico che non presenta rapporti vascolari diretti con la placenta e sopravvive grazie alla perfusione arteriosa retrograda fornitagli dal gemello "pompa", che invece è dotato di un normale sistema cardiocircolatorio [23]. Il sangue fluisce dal gemello sano a quello acardico tramite l'arteria ombelicale (che normalmente veicola il sangue in senso centrifugo dal feto alla

placenta) e refluisce attraverso la vena ombelicale (che invece normalmente veicolerebbe il sangue in senso centripeto dalla placenta al feto); così si costituisce una perfusione arteriosa invertita, da cui il nome. (Fig. 8) Questo tipo di perfusione è letale per il gemello acardico, che presenterà un grave difetto della morfogenesi dovuto alla mancata perfusione del distretto cefalico; il gemello “pompa” invece può presentare idrope, epatosplenomegalia, visceromegalia, idrotorace, versamento pericardico, cardiomegalia e edema sottocutaneo. L’acardia è una condizione incompatibile con la vita, quindi non suscettibile di trattamento; è importante invece intervenire sul gemello sano per ridurne la mortalità, tramite terapia medica (indometacina e digossina) o trattamento invasivo endouterino tramite l’impiego di radiofrequenze (RFA) o ablazione laser, al fine di interrompere le connessioni vascolari fra i due gemelli. La RFA rappresenta ad oggi il trattamento di prima scelta per questa condizione [24].

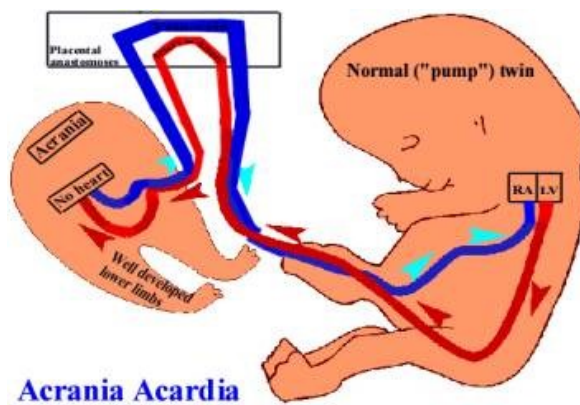


Fig. 8-Trap syndrome

- *Annodamento o compressione dei funicoli*; interessa solo la gravidanza moncoriale monoamniotica. I due gemelli condividono lo stesso sacco amniotico e questa situazione può favorire la formazione di nodi dei funicoli o di avvolgimenti degli stessi intorno ai feti. Questa circostanza può causare sofferenza fetale, documentata da accelerazioni e decelerazioni del battito cardiaco fetale rilevate tramite cardiotocografia.

1.6 GESTIONE DELLA GRAVIDANZA GEMELLARE

La gravidanza multipla è per definizione una gravidanza ad alto rischio, perciò la sua gestione clinica deve essere specifica ed individualizzata. [9-15] Innanzitutto, l'adozione di un ***intervento nutrizionale specifico*** sembra efficace nel ridurre gli eventi avversi; una sana ed adeguata alimentazione contribuisce al buon esito della gravidanza pertanto la consulenza nutrizionale va inclusa nel programma assistenziale [24-25]. Inoltre, andrà valutato il BMI (Body Mass Index) e per le pazienti che rientrano nel normopeso, sarà suggerito un aumento ponderale di 17-25 Kg [24-26]. Al contrario, fattori di rischio ambientali quali fumo di sigaretta, abuso di alcool ed eccessiva attività fisica, andrebbero evitati [2-9-11].

Durante il primo controllo andrà effettuato ***un adeguato counseling*** relativo alle complicanze correlate al tipo di gravidanza e alle modalità di controllo che saranno impiegate, esami da effettuare e frequenza dei controlli. Per quanto riguarda la ***frequenza dei controlli***, per le gravidanze BB è raccomandata una frequenza mensile dei controlli clinici che andrà intensificata nel terzo trimestre per l'aumentato rischio di complicanze ostetriche; anche il controllo ecografico andrà effettuato con cadenza mensile ed intensificato nel caso in cui emerga una discrepanza di crescita fra i due feti [12-13-26]. Per le gravidanze MB e MM, a causa del maggior rischio di morbidità e mortalità fetale, la valutazione clinica ed ecografica andrebbe effettuata presso ambulatori dedicati, e sono raccomandati una valutazione clinica mensile e esami ecografici ogni 15 giorni [27-28].

L'***emocromo*** a 20-24 settimane è indicato per individuare le pazienti che necessitano di integrazione di acido folico e ferro, per contrastare la maggior incidenza di anemia delle gravidanze multiple. L'esecuzione della curva glicemica segue le stesse indicazioni della gravidanza singola, così come seguono lo stesso trattamento altre complicanze della gravidanza tra cui iperemesi, ipertensione, anemia, emorragia al parto e depressione postpartum, pur essendo più frequenti [29].

Per quanto riguarda il ***monitoraggio cardiotocografico e la flussimetria doppler dell'arteria ombelicale***, nella gravidanza bicoriale biamniotica non complicata, non si associa ad un miglioramento dell'esito e la sorveglianza è riservata a quelle situazioni che presentano complicanze materne o fetali. La gravidanza monocoriale monoamniotica è invece caratterizzata da un elevatissimo rischio di mortalità legato all'attorcigliamento dei cordoni; in

questo caso il monitoraggio ostetrico deve essere intensificato dalla 28° settimana, con somministrazione di corticosteroidi e parto programmato a 32-34 settimane [9-12-13-30]. Il monitoraggio cardiotocografico comunque non ha valore predittivo nell'insorgenza dell'evento acuto.

Il parto pretermine spontaneo è una delle complicanze più frequenti della gravidanza multipla; tuttavia gli interventi profilattici quali cerchiaggio, ospedalizzazione, bed rest, tocolisi, pessario e terapia farmacologica con progesterone, non si sono rivelati efficaci [2-9-15].

Infine, la gestione della gravidanza multipla andrebbe riservata a centri di riferimento, in particolare in caso di gravidanze gemellari monocoriali mono- e biamniotiche, trigemine, bicoriali biamniotiche complicate e gravidanze multiple identificate ad alto rischio per la Sindrome di Down.

1.7 ESPLETAMENTO DEL PARTO

Nella gravidanza multipla, l'epoca gestazionale media al parto è inferiore rispetto alla gravidanza singola, tanto che nel 60% di queste gravidanze il parto si espleta prima della 37° settimana [1]. Secondo le linee guida NICE 2011 e ACOG 2014, l'espletamento del parto deve essere considerato:

- Dalla 32° alla 34° settimana nelle monocoriali monoamniotiche;
- Dalla 36° alla 37° settimana nelle monocoriali biamniotiche;
- A 38 settimane per gravidanze bicoriali biamniotiche.

Il proseguimento oltre la 38° settimana aumenta il rischio di morte fetale.

La modalità di espletamento del parto nelle gravidanze gemellari dipende da vari fattori: amnioticità, corionicità, presentazione dei feti, epoca gestazionale, esperienza degli operatori coinvolti [29]. Per quanto riguarda la presentazione dei gemelli al momento del parto, questa può essere cefalica-cefalica, cefalica-non cefalica e primo gemello non cefalico. In quest'ultimo caso è consigliabile il taglio cesareo elettivo per evitare il fenomeno, seppur raro, dell'uncinamento dei gemelli.

Per la presentazione cefalica, secondo lo studio di Barrette et al. (2013), nei casi analizzati di gravidanze mono e bicoriali tra le 32 e le 38 settimane e presentazione cefalica del primo gemello, non ci sono differenze di morbidità e mortalità neonatali in relazione a parto vaginale o taglio cesareo programmato [30]. Il taglio cesareo elettivo dovrebbe pertanto essere riservato alle seguenti indicazioni: gravidanza gemellare monoamniotica, gemelli congiunti, primo

gemello in presentazione podalica o trasversa, oltre alle indicazioni assolute riguardanti anche le gravidanze singole (placenta previa, grave gestosi materna, distacco intempestivo di placenta normalmente inserita, estesa cicatrice uterina da pregressa isterotomia, prolasso del funicolo alla rottura del primo sacco, insorgenza di segni di sofferenza fetale).

È comunque importante ricordare sempre che la progressione della fase attiva del travaglio di parto in una gravidanza gemellare con primo feto cefalico è più lenta rispetto ad una gravidanza singola [31].

Le pazienti in cui entrambi i feti sono in posizione cefalica sono candidate al parto vaginale ma vanno informate della possibilità di conversione a parto operativo nel caso di insorgenza di complicanze. In questi casi, dopo la nascita del primo gemello, mediante ecografia viene valutata la posizione del secondo per verificare se questo, trovandosi in uno spazio più ampio, abbia modificato la sua presentazione.

Non vi sono certezze sull'intervallo di tempo di attesa per la nascita del secondo gemello ma un intervallo superiore ai 30 minuti può peggiorare significativamente la prognosi e in alcuni casi è indispensabile ricorrere al taglio cesareo d'urgenza. Un tempo di attesa di 30 minuti sembra essere ragionevole ma il secondo gemello va continuativamente monitorato tramite cardiotocografia.

Durante il secondamento si può assistere ad una abbondante emorragia; pertanto viene somministrata sistematicamente ossitocina endovena durante il travaglio, ergometrina dopo l'espulsione della placenta e si continua l'ossitocina diluita per almeno due ore dopo l'avvenuto secondamento. Nelle gravidanze gemellari potrebbe insorgere una condizione detta *atonía uterina*, nel caso in cui l'utero, eccessivamente disteso, non sia più in grado di contrarsi efficacemente da comprimere i vasi placentari rimasti aperti dopo il secondamento; questa situazione deve essere diagnosticata tempestivamente e trattata con ossitocina per via endovenosa o prostaglandine intramuscolo.

Per concludere, secondo le recenti linee guida [2], nell'assistenza al travaglio e al parto di una gravidanza gemellare è necessario:

- Controllare ecograficamente al ricovero la presentazione dei feti;
- Incoraggiare l'anestesia loco-regionale in travaglio, anche nell'evenienza dell'esecuzione di un parto operativo in urgenza;
- Registrare in modo continuativo durante il travaglio la frequenza cardiaca di entrambi i feti.

2. TROMBOFILIA

La trombofilia o stato trombofilico è definita come la tendenza al tromboembolismo venoso e/o arterioso, determinata da cause congenite e/o acquisite, caratterizzata dalla comparsa di manifestazioni cliniche entro la sesta decade di vita, non riconducibili a cause apparenti e con la tendenza a recidivare. Le alterazioni trombofiliche sono in maggioranza congenite, alcune estremamente rare nella popolazione generale, come i deficit di antitrombina con una prevalenza stimata pari al 0,02%, altre invece più frequenti, come la resistenza alla proteina C attivata FV Leiden, pari a circa il 5%. I difetti trombofilici non sono malattie, ma condizioni predisponenti alla trombosi, che presentano un rischio di complicanze differente a seconda del tipo di difetto e la cui individuazione può consentire una maggiore efficacia nell'approccio terapeutico del paziente affetto da trombosi, come ad esempio definire la durata ottimale della terapia anticoagulante ed individuare i soggetti a maggior rischio di eventi al fine di orientare strategie preventive più adeguate. [62]

In gravidanza, si instaura uno stato trombofilico fisiologico, caratterizzato da un aumento dei fattori procoagulanti e una diminuzione degli anticoagulanti fisiologici, finalizzato a ridurre il rischio emorragico. Tuttavia ci sono delle condizioni di trombofilia ereditaria (deficit della coagulazione geneticamente determinati) e acquisita (sindrome da anticorpi antifosfolipidi, diabete, restrizione della crescita fetale, preeclampsia) in cui questo rischio si accentua. Tutti questi stati trombofilici, oltre che al rischio trombotico, si associano a un deficit nel processo di placentazione, fattore che condiziona in maniera negativa l'outcome materno-fetale.

In particolare, il sistema fibrinolitico partecipa alla regolazione dell'invasione trofoblastica umana precoce. La plasmina promuove l'invasione trofoblastica attivando determinate metalloproteinasi della matrice e degradando direttamente alcuni componenti della matrice extracellulare della decidua. Normalmente questo determina la trasformazione delle arterie spirali materne, da piccoli vasi ad alta resistenza, a vasi capacitativi di calibro elevato, in grado di fornire una adeguata perfusione placentare per sostenere il feto in crescita.

La riduzione dell'invasione trofoblastica invece, si traduce in un letto vascolare più ristretto, con minore capacità di perfusione, minore apporto di ossigeno, di elementi nutritivi e quindi minore crescita fetale con tendenza a aggravarsi con il progredire della gravidanza. [58] [59] [60]

2.1 STATO TROMBOFILICO FIOLOGICO DELLA GRAVIDANZA

La gravidanza è correlata ad uno stato di ipercoagulabilità, dovuto soprattutto agli effetti dei cambiamenti ormonali fisiologici, che possono influenzare i livelli plasmatici di fattori della coagulazione o di proteine anticoagulanti. È noto che i principali cambiamenti a livello emostatico in gravidanza sono:

- L'aumento di fattori procoagulanti;
- La riduzione di fattori anticoagulanti;
- Una ridotta fibrinolisi.

Questi si traducono, in ultima analisi, in un aumento della generazione di trombina.

Oltre a questi cambiamenti sistemici, non sono da sottovalutare i cambiamenti a livello locale, dovuti soprattutto alla formazione della placenta, e che possono influenzare l'espressione del TF (fattore tissutale) e del TFPI (Tissue factor pathway inhibitor). Quest'ultimo è un inibitore delle risposte coagulative, molto importante per la via estrinseca, che è presente appunto in maniera ridotta durante la gravidanza.

Tutti questi fattori (tabella I) agiscono insieme per comporre lo stato di ipercoagulabilità.

	Aumento	Diminuzione	Nessun cambiamento
Cambiamenti sistemici			
Fattori procoagulanti	I, V, VII, VIII, IX, X	XI	TF
Fattori anticoagulanti	TM solubile	PS	AT, PC
Proteine adesive	vWF		
Proteine fibrinolitiche	PAI-1, PAI-2	t-PA	TAFI
Piastrine	betaTG, PF4	Piastrine	
Microparticelle	MP		
Cambiamenti locali	TF	TFPI	

Tabella I. Principali cambiamenti a livello emostatico in gravidanza [1,2]

AT = antitrombina; PAI = inibitore dell'attivazione del plasminogeno; PC = proteina C; PF4 = fattore piastrinico 4; TAFI = inibitore della trombina attivante la fibrinolisi; TAT = complesso trombina-antitrombina; TFPI = *Tissue factor pathway inhibitor*; TM = trombomodulina; t-PA = attivatore tissutale del plasminogeno; vWF = fattore di von Willebrand

Tali cambiamenti non rimangono stabili ma, in alcuni casi, si differenziano a seconda della settimana di gestazione. (Tabella II) Il fattore che fa registrare l'aumento più importante è il **fattore VIII**, che al termine della gravidanza è di molte volte maggiore rispetto all'inizio. Un altro elemento fondamentale è l'aumento della concentrazione di **fibrinogeno** nel plasma, che,

da livelli di circa 2,5-4 g/l in condizioni di non gravidanza, può arrivare fino a 6,0 g/l in gravidanza avanzata e durante il parto. Tale considerazione diventa importante soprattutto nel caso in cui sia necessario somministrare fibrinogeno, ad esempio per un'emorragia acuta.

A seconda delle settimane di gestazione variano anche i livelli di alcune **proteine anticoagulanti** (antitrombina, proteina C e proteina S): dati di letteratura indicano che per antitrombina e proteina C i valori rimangono abbastanza stabili, mentre i valori di proteina S fanno registrare una notevole riduzione. Tale netta diminuzione potrebbe addirittura condurre a un'errata diagnosi di deficit di proteina S, laddove non si considerino i cambiamenti fisiologici dovuti alla gravidanza. Quindi, la proteina S registra una forte riduzione nel corso della gravidanza, ma immediatamente dopo il parto si assiste a un recupero quasi totale dei suoi livelli.

Variabili (media $\pm$ SD)	Settimana di gestazione			Parto	5 settimane post-partum	Dopo lattazione	Valori normali
	12-15	24	35				
Piastrine ($\times 10^9/l$)	275 $\pm$ 64	256 $\pm$ 49	244 $\pm$ 52	246 $\pm$ 54	243 $\pm$ 61	267 $\pm$ 57	150-400
Fibrinogeno (g/l)	3,7 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 1,0	2,1-4,2
Complesso protrombinico (%)*	120 $\pm$ 27	140 $\pm$ 27	130 $\pm$ 27	144 $\pm$ 30	102 $\pm$ 8,7	90 $\pm$ 18	70-30
Antitrombina (U/ml)	1,02 $\pm$ 0,10	1,07 $\pm$ 0,14	1,07 $\pm$ 0,11	1,06 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,21	0,85-1,25
Proteina C (U/ml)	0,92 $\pm$ 0,13	1,06 $\pm$ 0,17	0,94 $\pm$ 0,2	1,01 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,14	0,91 $\pm$ 0,17	0,68-1,25
Proteina S totale (U/ml)	0,83 $\pm$ 0,11	0,73 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,18	0,70-1,70
Proteina S free (U/ml)	0,26 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,06	0,20-0,50
Fibrina solubile (nmol/l)	9,2 $\pm$ 8,6	11,8 $\pm$ 7,7	13,4 $\pm$ 5,2	17,2 $\pm$ 13,9	9,4 $\pm$ 4,4	9,7 $\pm$ 6,2	<15
Trombina-antitrombina (μ g/l)	3,1 $\pm$ 1,4	5,9 $\pm$ 2,6	7,1 $\pm$ 2,4	8,2 $\pm$ 2,5	1,9 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,7	<2,7
D-dimeri (μ g/l)	91 $\pm$ 24	128 $\pm$ 49	198 $\pm$ 58	226 $\pm$ 101	84 $\pm$ 14	81 $\pm$ 3,4	<80
PAI-1 (AU/ml)	7,4 $\pm$ 4,9	14,9 $\pm$ 5,2	37,8 $\pm$ 19,4	33,3 $\pm$ 14,5	6,0 $\pm$ 3,1	8,1 $\pm$ 4,9	<15
PAI-2 (μ g/l)	31 $\pm$ 14	84 $\pm$ 16	160 $\pm$ 31	150 $\pm$ 45	3,0 $\pm$ 8,7	1,3 $\pm$ 1,9	<5
Anticorpi anti-cardiolipina	2/25	2/25	3/23		2/16	2/11	0

Tabella II. Parametri emostatici in corso di gravidanza. Modificato da [4]

Lo stato di ipercoagulabilità in gravidanza è influenzato anche dalla resistenza alla APC (**proteina C attivata**): in genere nelle pazienti gravide non si tratta di resistenza alla APC correlata alla mutazione del gene del fattore V Leiden (la più importante causa di resistenza alla APC), ma di una resistenza acquisita. Infatti la gravidanza può, in un certo senso, “mimare” la resistenza alla APC, portando ad uno stato di ipercoagulabilità. Oggi sono disponibili tecniche molto sofisticate per misurare lo stato di ipercoagulabilità, come ad esempio il Thrombin generation-based APC resistance test.

Effettuando questo test sulle donne in gravidanza si è osservato che:

- a 8 settimane la generazione di trombina risulta più alta in confronto al valore di base;
- a 12 settimane si registra un ulteriore aumento;
- a 16 settimane di gestazione si ha un altro incremento.

In gravidanza quindi si instaura una condizione protrombotica correlata all'aumento dell'attività della trombina e alla riduzione del controllo inibitorio dell'APC.

Un altro rilevante cambiamento a livello emostatico in gravidanza riguarda la **fibrinolisi**: durante tutto il periodo della gestazione si ha una riduzione dell'attività fibrinolitica, con la fibrinolisi che permane bassa durante il travaglio e il parto, per ritornare a livelli normali circa un'ora dopo l'espulsione della placenta.

È noto che anche i livelli del **D-dimero** aumentano molto in gravidanza: tale incremento si registra dalle prime settimane di gestazione fino al termine della gravidanza e nel post-partum, indipendentemente dal tipo di parto (vaginale o cesareo). L'aumento dei livelli di D-dimero non è correlato al rischio clinico di trombosi nelle donne in gravidanza pertanto, in questa situazione, non è utile fare ricorso alla sua valutazione per la diagnosi di trombosi venosa profonda o tromboembolismo polmonare. La ricerca di un differente valore di cut-off per i livelli di D-dimero in gravidanza è tuttora in atto, seppure ancora in fase preliminare.

Anche le **piastrine** subiscono un notevole mutamento durante la gravidanza: solitamente si instaura una sorta di trombocitopenia non associata a compromissione dell'emostasi né ad outcome sfavorevoli per la madre o per il feto; è la più comune anomalia della coagulazione osservata in gravidanza, ma non richiede trattamenti particolari. Occasionalmente si può riscontrare un livello elevato di IgG associate a piastrine (PAIgG). Lo stato di trombocitopenia non deve comunque essere sottovalutato: soprattutto nel caso in cui si debba mettere in atto il trattamento di una emorragia severa nel post-partum, è assolutamente fondamentale avere la consapevolezza che i valori di partenza delle piastrine sono molto diversi rispetto a una paziente non gravida. Immediatamente dopo il parto si registra un aumento delle piastrine, in particolar modo nelle pazienti sottoposte a taglio cesareo.

Quindi, da quanto detto possiamo dedurre che il rischio trombotico è aumentato in gravidanza per i cambiamenti fisiologici nel sistema della coagulazione, ma lo è anche per le condizioni fisiche predisponenti che si vengono ad instaurare nella gravida:

- stasi nelle vene degli arti inferiori dovuta alla compressione dei vasi iliaci da parte dell'utero;
- diminuita mobilità della donna;
- parto soprattutto se cesareo.

2.2 STATO TROMBOFILICO NON FISIOLÓGICO IN GRAVIDANZA

Esistono fattori aggiuntivi patologici responsabili dell'incremento dello stato di ipercoagulabilità in gravidanza. Le patologie in questione possono essere ereditarie o non ereditarie. È stato ipotizzato che queste condizioni di trombofilia aumentino il rischio di trombosi a livello dei vasi a basso flusso dell'interfaccia materno-placentare, portando a complicanze come aborti spontanei, perdita fetale, compromissione della crescita fetale, distacco di placenta. Inoltre, il danno endoteliale che si instaura provoca uno stato infiammatorio che incrementa anche il rischio trombotico materno.

Iniziamo ad analizzare le condizioni di trombofilia ereditaria:

2.2a STATI DI TROMBOFILIA EREDITARIA

La trombofilia ereditaria è una genetica tendenza alla trombosi venosa, che riconosce diverse cause:

- Mutazione del fattore V di Leiden;
- Mutazione G20210A del gene della protrombina;
- Deficit di proteina S;
- Deficit di proteina C;
- Deficit di antitrombina;
- Iperomocisteinemia dovuta a mutazione di MTHFR (MetilenTetraHydroFolato Reduttasi);
- Mutazione del promotore del gene del PAI-1;
- Polimorfismo -455G/A del gene del Beta-Fibrinogeno (Fattore I).

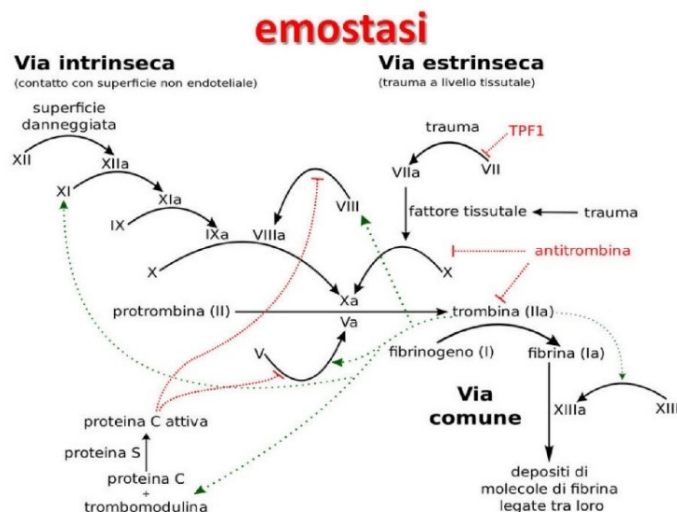


Fig. 9- emostasi

Analizziamo ciascuna condizione:

- *Mutazione del fattore V di Leiden*; è una variante del fattore V. Il fattore V è uno dei peptidi coinvolti nella cascata coagulativa plasmatica, svolge la sua azione come cofattore del fattore X per attivare la protrombina (fattore II) a trombina, la quale, a sua volta, permette la scissione del fibrinogeno in fibrina. (Fig. 9) Il suo effetto pro-coagulante è normalmente inibito dalla proteina C attivata (APC, un anticoagulante naturale) che limita l'estensione del coagulo attraverso il taglio del fattore V attivato a livello di una unità di arginina rendendolo inattivo. Una variazione del gene (polimorfismo) comporta la sostituzione dell'arginina con un altro aminoacido, la glutammina, la quale impedisce il taglio da parte della proteina C attivata. Il fattore mutato diventa così resistente all'azione della proteina C attivata.

Questa variante, data dalla mutazione R506Q, aumenta il rischio di tromboembolia venosa, tromboembolia polmonare o entrambi (soprattutto se in combinazione con l'uso di contraccettivi orali) e aborto spontaneo, poiché causa uno stato di ipercoagulabilità.

È lo stato di ipercoagulabilità più diffuso negli eurasici. Lo troviamo in circa il 3% della popolazione mondiale con una prevalenza di circa il 5% dei caucasici, mentre la variazione è più rara tra ispanici e afroamericani ed è molto rara negli asiatici.

Fino al 25-30% dei pazienti con una trombosi venosa profonda o un'embolia polmonare ha questo polimorfismo. Il rischio dell'evento trombotico è comunque dato dall'interazione tra i vari fattori di rischio, di cui il fattore V alterato fa parte. In questo senso eventuali fattori di rischio acquisiti per la trombosi venosa (come il fumo, l'uso della pillola

anticoncezionale, operazioni chirurgiche recenti, immobilizzazione) ne aumentano ulteriormente la probabilità. Ereditare una o due copie del gene mutato porta, poi, ad un rischio diverso di sviluppare una trombosi: si calcola che l'avere una copia (eterozigosi) aumenti il rischio da due a otto volte, mentre averne due copie (omozigosi) possa aumentare il rischio da venti fino a ottanta volte. Considerando che il rischio di sviluppare una trombosi, nella popolazione è complessivamente pari a circa 1 su 1000 all'anno, la presenza di una copia del gene del fattore V Leiden aumenta il rischio tra 1 su 250 a 1 su 125. Avere due copie può portare il rischio fino a 1 su 12. La condizione di omozigosi è necessariamente più rara dell'eterozigosi, ed è stimata in circa l'1% delle persone con fattore V di Leiden [37] [38] [39] [40].

In gravidanza donne con il fattore V di Leiden hanno un aumentato rischio di trombosi venosa profonda e di embolia polmonare.

Inoltre, c'è un aumento del rischio di:

- Preeclampsia,
- Aborto,
- Morte fetale,
- Feti nati morti.

Tutto ciò potrebbe essere causato da trombosi della placenta, del cordone ombelicale o del feto (nel caso in cui questo abbia ereditato geni mutati) o da influenze che il sistema della coagulazione potrebbe avere nello sviluppo placentare [41].

- *Mutazione G20210A del gene della protrombina*; la protrombina o fattore II della coagulazione svolge un ruolo fondamentale nella cascata coagulativa in quanto la sua attivazione in trombina porta alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina e quindi alla formazione del coagulo. (Fig. 9)

È stata descritta una variante genetica associata ad elevati livelli di protrombina funzionante nel plasma con conseguente aumentato rischio di trombosi, specie di tipo venoso. Trattasi di una sostituzione di una G (guanina) con una A (adenina) alla posizione 20210 (G20210A), una regione non trascritta del gene dalla parte del 3' che è sicuramente coinvolta nella regolazione genica post-trascrizionale. La frequenza genica della variante è bassa (1,0-1,5%) con una percentuale di eterozigoti del 2-3%. L'omozigosi è rara.

In gravidanza questa mutazione si associa a:

- Perdita fetale precoce ricorrente (prima della 13esima settimana);
 - Perdita fetale tardiva non ricorrente (dopo la 22esima settimana);
 - Feti nati morti [41].
- *Deficit di proteina S*: il deficit congenito della proteina S è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva, dovuta a mutazioni del gene PROS1 (3q11-q11.2), caratterizzata da trombosi venose secondarie per riduzione della sintesi e/o dell'attività della proteina S. Sono note tre forme biologiche: il tipo 1 e il tipo 3 sono deficit quantitativi, con livelli bassi di antigene libero (in presenza di livelli normali di proteina S totale nel deficit di tipo 3 e livelli più bassi di proteina S totale nel tipo 1), mentre il tipo 2 è un deficit qualitativo, con livelli normali di proteina S totale e libera [42].

La prevalenza del deficit parziale di proteina S (soggetti eterozigoti) è stimata tra 0,16 e 0,21% nella popolazione generale, mentre la prevalenza del deficit grave (soggetti omozigoti o eterozigoti composti) non è nota, anche se probabilmente è paragonabile a quella del deficit grave di proteina C (stimato in 1/500.000). I due sessi sono interessati in uguale misura. Il deficit grave di proteina S si manifesta nelle ore o nei giorni successivi alla nascita, con porpora fulminante o trombosi venosa massiva. La porpora fulminante mette a rischio la vita del paziente e causa coagulazione disseminata e necrosi tissutale. Può, inoltre, manifestarsi una retinopatia grave del prematuro (ROP). I pazienti eterozigoti, invece, sono di solito asintomatici.

Il segno più comune della malattia è la trombosi venosa profonda degli arti inferiori, con o senza embolia polmonare, ma può insorgere anche una trombosi arteriosa. Questi episodi trombotici sono dovuti principalmente all'associazione con altri fattori di rischio, come gli interventi chirurgici, la gravidanza o l'immobilizzazione protratta. La prognosi è grave nei pazienti omozigoti o eterozigoti composti ed è buona nei pazienti eterozigoti.

Nelle donne gravide, il deficit di proteina S si associa a:

- Perdita fetale tardiva non ricorrente;
- Feti nati morti;
- Restrizione di crescita fetale;
- Preeclampsia [41].

- *Deficit di proteina C*; la proteina C è il maggiore anticoagulante fisiologico. La sua sintesi avviene nel fegato ed è vitamina K dipendente. È attivata dalla trombina e la forma attiva (con la proteina S come cofattore) degrada il fattore V e il fattore VIII. (Fig.9) Il deficit eterozigote della proteina C plasmatica ha una prevalenza tra lo 0,2 e lo 0,5%. Circa il 75% dei soggetti con questo deficit va incontro a tromboembolismo venoso (il 50% entro i 50 anni di età).

Il deficit omozigote o con doppia eterozigosi causa la porpora fulminante del neonato. [61]

In gravidanza un deficit di proteina C pare che non si associ a perdita fetale, ma a:

- Feti nati morti;
- Preeclampsia [41].

- *Deficit di antitrombina III*; l'antitrombina è una proteina che inibisce la trombina e i fattori Xa, IXa e XIa, inibendo così la trombosi. (Fig. 9) Il suo deficit si trasmette in maniera autosomica dominante. La forma eterozigote ha una prevalenza di circa lo 0,2-0,4% e in circa la metà dei soggetti affetti si sviluppano trombosi venose. Il deficit omozigote, invece, è probabilmente letale per il feto in utero.

In gravidanza si associa a feti nati morti [41].

- *Iperomocisteinemia da mutazione di MTHFR*; la mutazione da citosina (C) a timina (T) in posizione 677 del gene della MTHFR (MetileneTetraHydroFolato Reduttasi) causa una riduzione del 50% dell'attività enzimatica di questo enzima. Questa variante ha una trasmissione autosomica recessiva e porta ad un aumento del livello plasmatico di omocisteina, specie dopo carico orale di metionina. La frequenza genica della mutazione in Europa è del 3-3,7%, con una prevalenza del genotipo omozigote pari all'8-15% della popolazione e del genotipo eterozigote pari al 42-46%.

Anche una seconda alterazione nel gene della MTHFR, la sostituzione di una adenina con una citosina in posizione 1298 (A1298C), è stata associata ad una diminuzione dei livelli di MTHFR.

L'iperomocisteinemia (aumento del livello plasmatico di omocisteina) risultante causa danno a livello vasale e aumenta il rischio cardiovascolare; questi sono gradualmente e continuamente e non esiste una soglia discriminante il rischio dal non-rischio. Ammettendo l'esistenza di una relazione lineare tra livelli di omocisteina e rischio di trombosi, si è calcolato che un incremento di 5 $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina causi un aumento di 7 volte del normale rischio di

arteriopatie periferiche e di 2,6 volte del normale rischio di trombosi venosa agli arti (soprattutto in persone giovani, sotto i 40 anni, e donne).

Il deposito sulla parete vasale di omocisteina, in seguito a mutazioni dell'MTHFR, risulta lesivo sia mediante un'azione diretta sull'endotelio e sulla parete vasale, sia attraverso un'azione sui fattori della coagulazione, sulle lipoproteine e sulle piastrine, con un aumento, in quest'ultimo caso, della adesività e della aggregabilità piastrinica. Le mutazioni C677T e A1298C rappresentano tuttavia un fattore di rischio cardiovascolare solo in soggetti con basso livello di folati: ciò sottolinea quindi l'importanza, sia nella prevenzione che nella terapia, dell'apporto nutrizionale di acido folico, il cui deficit risulta un cofattore patogeno necessario [43].

In gravidanza si associa a:

- Poliabortività;
 - Preeclampsia;
 - Distacco di placenta.
-
- *Mutazione del gene del promotore del PAI-1*; l'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) è il maggiore inibitore del sistema fibrinolitico ed è prodotto, oltre che dalle piastrine, da una varietà di cellule tra cui quelle epatiche, le cellule endoteliali e quelle muscolari lisce delle pareti vasali. Aumentati livelli di PAI-1 nel plasma sono associati con lo sviluppo di infarto miocardico e la formazione/progressione di malattie infiammatorie croniche come l'aterosclerosi e malattie cardiovascolari, specie nei soggetti fumatori ed ipertesi. Inoltre, alti livelli di PAI-1 sono stati collegati con fattori di rischio quali l'obesità, l'insulino-resistenza, l'intolleranza al glucosio, l'ipertensione e la dislipidemia, che insieme sono componenti della sindrome metabolica. Il gene PAI-1 è situato sul cromosoma 7 e il polimorfismo genico 4G/5G si trova nella regione del promotore del gene PAI-1, che comporta la delezione guaninica in posizione nucleotidica -675 rispetto al sito di inizio della trascrizione. Il PAI-1 -675 allele 4G ha un'attività trascrizionale maggiore del PAI-1 -675 allele 5G e la variante -675 4G in omozigosi è associata con più alti livelli plasmatici di PAI-1 (circa il 25% più alti rispetto ai soggetti con genotipo 5G/5G). Pertanto, l'allele 4G è associato ad aumentato rischio trombotico.

In gravidanza il PAI-I è un importante fattore per portare a termine la gravidanza, infatti forme mutate possono contribuire a trombosi e infiammazione, con conseguenti rilevanti complicanze. Inoltre, donne con genotipo 4G/4G hanno una maggiore incidenza di complicanze della gravidanza e del parto rispetto ai soggetti 5G/5G [44].

- *Polimorfismo -455G/A del gene del Beta-Fibrinogeno (Fattore I)*; il fattore I (fibrinogeno) è una glicoproteina sintetizzata dal fegato e è presente in circolo con una concentrazione plasmatica di 200-400 mg/dl. Durante la fase propagativa della coagulazione la trombina distacca i fibrinopeptidi A (FpA) e B (FpB) dal fibrinogeno, dando luogo ai frammenti solubili o monomeri di fibrina e al tempo stesso attiva il fattore XIII in XIIIa che trasforma la fibrina solubile in fibrina insolubile o stabile. [Sante Tura, “Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici” Società editrice Esculapio 2015] Il polimorfismo presente nella regione del promotore del gene del Beta Fibrinogeno (FGB), consistente in una transizione G->A in posizione -455 (-455G-A), è associato a livelli plasmatici elevati di fibrinogeno. L’iperfibrinogenemia è associata a episodi tromboembolici arteriosi e venosi; inoltre, può contribuire alla patogenesi di disturbi placentari vascolari associati a complicanze ostetriche. L’incremento del fibrinogeno dovuto al polimorfismo -455G/A può sommarsi all’aumento che avviene fisiologicamente in gravidanza, e perciò può predisporre a complicanze ostetriche. [Camilleri RS, Peebles D, Portmann C, Everington T, Cohen H. -455G/A beta-fibrinogen gene polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T, and placental vascular complications. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15(2):139-147.] In più è noto che questo polimorfismo, soprattutto se è presente insieme a altri fattori trombofilici ereditari, è associato a un aumentato rischio di interruzioni di gravidanza ricorrenti. [Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol*. 2006;56(4):230-236.]

2.2b STATI DI TROMBOFILIA ACQUISITA

Esistono delle condizioni non ereditarie e non legate a deficit genetici di fattori della coagulazione che si associano ad un maggior rischio trombotico; ovviamente questo stato di ipercoagulabilità sarà ulteriormente accentuato in gravidanza. Tra le patologie che possiedono queste caratteristiche possiamo elencare:

- sindrome da aPL;
- preeclampsia (PE);
- insulino-resistenza;
- diabete;
- ipertensione;

- obesità;
- sindrome metabolica;
- ritardo di crescita fetale (FGR).

Prendiamo in considerazione alcune di queste condizioni.

- *Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*; la sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS) è una sindrome caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) e un quadro clinico costituito da trombosi (venose e arteriose) e aborti ricorrenti. Questa sindrome può esistere da sola (APS primaria) o in associazione ad altre malattie autoimmuni, tra cui il Lupus Eritematoso Sistemico (APS secondaria). La prevalenza della APS non è nota, ma si stima che gli aPL siano presenti nel 2-5% della popolazione generale. L'APS di solito esordisce nei giovani adulti o negli adulti di mezza età, ma può presentarsi a tutte le età. Si ritiene che sia una malattia multifattoriale e in alcune famiglie sembra esserci una predisposizione genetica. Probabilmente gli aPL agiscono interferendo con la funzione delle cellule endoteliali e delle proteine di legame sui vasi sanguigni, causando uno stato proinfiammatorio e procoagulante che evolve nella trombosi. In gravidanza la patologia si associa a:
 - Morte non spiegata di un feto sano dopo la 10° settimana di gestazione;
 - Nascita prematura di un bambino sano prima della 34° settimana;
 - 3 o più aborti ripetuti prima della 10° settimana di gestazione [45].
- *Diabete mellito*; il diabete è un disordine metabolico, principalmente caratterizzato dall'elevato livello glicemico e da complicanze secondarie alla microangiopatia e alla macroangiopatia, direttamente responsabili dell'elevata morbilità e mortalità della malattia. Il diabete mellito di tipo 2, caratterizzato dal deficit relativo di insulina e/o dalla resistenza all'insulina, rappresenta la forma più frequente di diabete (circa il 90%) ed è associato a fattori di rischio quali l'invecchiamento della popolazione generale, l'obesità e la sedentarietà. In questo contesto sono in aumento le evidenze scientifiche che dimostrano una associazione del diabete mellito con un rischio aumentato di tromboembolismo venoso. [63]
 Infatti, nella malattia diabetica si ha uno squilibrio del sistema emostatico, in particolare si hanno alterazioni dell'endotelio, della funzione piastrinica, della fase coagulatoria e del sistema fibrinolitico.

- *Alterazioni dell'endotelio:* l'endotelio ha una funzione dinamica di regolazione tra meccanismi trombotici, anticoagulanti e fibrinolitici. Il danno dell'endotelio si associa a rapida adesione e aggregazione delle piastrine e ad attivazione della cascata coagulativa, mentre prostaciclina e ossido nitrico (NO), normalmente prodotti dall'endotelio integro, inibiscono l'attivazione piastrinica e favoriscono il rilasciamento delle cellule muscolari, permettendo l'incremento del flusso ematico.

Nei pazienti affetti da diabete mellito si ha un ridotto rilascio di prostaciclina e NO con conseguente vasocostrizione; inoltre, si hanno elevati livelli plasmatici di fattore di von Willebrand (vWF), fattore pro-coagulante, che è espressione di disfunzione/danno endoteliale.

Ricapitolando, nei pazienti affetti da diabete mellito si hanno:

- alterata sintesi di NO;
 - elevati livelli plasmatici di vWF;
 - ridotta elasticità dei vasi;
 - ridotto rilascio di prostaciclina.
- *Alterazioni funzionalità piastrinica:* le caratteristiche funzionali delle piastrine dei pazienti diabetici differiscono significativamente da quelle di soggetti normali e tali modificazioni sono responsabili dell'aumentata aggregabilità e adesività delle stesse. La persistente attivazione piastrinica con produzione di trombanoA2 è probabilmente dovuta allo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia che determina una aumentata perossidazione dell'acido arachidonico a formare isoprostani biologicamente attivi. Invece, l'aumentata aggregabilità potrebbe essere dovuta all'aumentata osmolarità associata all'iperglicemia che può determinare l'attivazione della glicoproteina IIb/IIIa e l'espressione di p-selectina. Questi meccanismi di attivazione delle piastrine nei pazienti diabetici non sono ancora certi, ma è provata l'aumentata attività piastrinica. Le piastrine dei pazienti diabetici inoltre, presentano un volume medio significativamente maggiore e le membrane presentano alterazioni della fluidità, secondarie a composizione lipidica e a glicosilazione delle proteine di

membrana. Infine, alterazioni dei livelli di magnesio intracellulare si associano ad aumentata aggregabilità e adesività delle piastrine dei pazienti diabetici.

- *Alterazioni dei livelli delle proteine plasmatiche della coagulazione*; tanto che la malattia può essere considerata di per sé una condizione di ipercoagulabilità. È stato, infatti, dimostrato che i livelli di fattore VII, fattore VIII, vWF, fibrinogeno risultano significativamente più elevati nei pazienti diabetici rispetto alla popolazione generale, ma il ruolo dell'iperglicemia/iperinsulinemia nella patogenesi di questi cambiamenti non è noto. Esistono evidenze che suggeriscono un effetto modulatore dell'iperglicemia/iperinsulinemia sui livelli plasmatici delle proteine coagulatorie. Ad esempio, è stato dimostrato che il controllo glicemico correla con i livelli di fibrinogeno e con i livelli di fibrinopeptide A plasmatico e urinario. Inoltre l'iperglicemia indotta rapidamente determina aumento del FVII coagulante (FVIIc) e del frammento protrombinico F1+2. La coagulazione inizia quando il fattore tissutale (TF) è esposto al sangue in seguito a danno o infiammazione dell'endotelio, ma anche direttamente dalla iperglicemia. L'attivazione della via del TF potrebbe dipendere dalla stimolazione dei monociti e delle cellule endoteliali ad esprimere TF. È dimostrato, infatti, che cellule endoteliali umane in coltura iperglicemica aumentano l'espressione del gene del TF, probabilmente secondaria allo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia.
- *Fibrinolisi*: è molto importante l'integrità dei meccanismi che regolano questo sistema, perché la ipofibrinolisi, caratteristicamente associata alla malattia diabetica, è una delle cause di sviluppo delle complicanze vascolari. Innanzitutto è ben stabilito da tempo che la profonda riduzione di attività fibrinolitica presente nel diabete è strettamente correlata con gli alti livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1). Il PAI-1, enzima appartenente alla famiglia delle serinproteasi, è considerato il più importante inibitore fisiologico della fibrinolisi, in quanto reagisce con l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) inattivandolo rapidamente. I livelli plasmatici di questa molecola nella malattia diabetica sono risultati correlati a body mass index, grasso viscerale, insulinemia, trigliceridemia, LDL (Low Density Lipoprotein), HDL (High Density Lipoprotein), infiammazione e stress

ossidativo. L'insulino-resistenza sembra quindi essere alla base delle modificazioni dei livelli plasmatici di PAI-1. Condizioni insulino-sensibilizzanti quali la perdita di peso e l'attività fisica o l'uso di farmaci quali la metformina e i tiazolidinedionici riducono infatti i livelli di PAI-1. Recentemente è stato individuato un nuovo potente inibitore della fibrinolisi, denominato inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-TAFI), sintetizzato prevalentemente nel fegato, ma anche nel tessuto adiposo e nelle cellule endoteliali, la cui attività ed i cui livelli plasmatici sono risultati significativamente aumentati nei pazienti diabetici. L'aumento dei livelli di TAFI nel diabete non sembrerebbe correlato all'insulino-resistenza, ma più verosimilmente ad altri fattori quali i livelli di colesterolo LDL.

Un'altra molecola interessante che è stata studiata nel diabete è la lipoproteina(a). I componenti della Lp(a) hanno similarità sia con le LDL che con il plasminogeno suggerendo che questa lipoproteina possa rappresentare un ponte tra i campi dell'aterosclerosi e della trombosi. Essa inibisce l'attivazione del plasminogeno in quanto ha una struttura simile, ma non ha la capacità di convertirsi in un enzima plasminosimile. Molti autori hanno trovato elevati livelli di Lp(a) in soggetti diabetici.

In gravidanza il diabete mellito gestazionale è definito come un'intolleranza glucidica diagnosticata in gravidanza, e comprende sia le forme a esordio gestazionale, sia quelle a esordio precedente ma non diagnosticate. Il GDM in senso stretto insorge durante la gravidanza e scompare durante il puerperio: la prevalenza di tale forma è del 2-4%. L'identificazione di questa patologia è fondamentale non solo per i risvolti materni (le pazienti con GDM hanno un rischio elevato di sviluppare un diabete franco durante la vita), ma anche feto-neonatali (aborti ricorrenti, morte in utero, polioidramnios, malformazioni e macrosomia, morte neonatale, ipoglicemia, iperbilirubinemia, ipocalcemia, policitemia, paralisi di Erb ecc.) e materno-fetali (distocia di spalla). [65]

Stesso discorso vale per le donne con diabete pregestazionale, sia esso di tipo I o di tipo II, in cui c'è un importante aumento delle morbidità perinatali, soprattutto se gemellari. [64]

- *Preeclampsia*; nota anche come gestosi, è una sindrome sistemica che si riscontra solo nell'ambito della gravidanza e che si caratterizza per la comparsa, nella seconda metà della stessa, di edemi, proteinuria e ipertensione. L'esatta incidenza della preeclampsia non è nota, ma si ritiene che possa collocarsi attorno al 5-8%. La PE rappresenta la maggiore causa di mortalità e morbidità materno-fetale in conseguenza delle sue complicanze: attacco eclamptico, distacco intempestivo di placenta, CID, ritardo di accrescimento intrauterino (FGR), morte endouterina del feto. Da non sottovalutare è anche il dato che vede la preeclampsia come un importante fattore di rischio per lo sviluppo a distanza di tempo, da parte della donna, di patologia cardiovascolare; in particolare le donne con preeclampsia ad esordio precoce o ricorrente, hanno un rischio significativamente più alto di morte cardiovascolare anche in epoca pre-menopausale [46] [47] [48] [49].

La gestosi sintomatica, come accennato in precedenza, si caratterizza per la presenza di tre sintomi fondamentali (edemi, proteinuria, ipertensione) senza manifestazioni soggettive particolari. Si parla, invece, di preeclampsia severa, che deve essere differenziata da quella lieve, in caso di presenza di uno o più dei seguenti sintomi: disfunzione del sistema nervoso centrale, sintomi di distensione della capsula del fegato, nausea e vomito, livelli sierici di AST (aspartato aminotransferasi) o ALT (alanina aminotransferasi) >2 volte il normale, pressione arteriosa sistolica >160 mmHg o pressione arteriosa diastolica >110 mmHg in 2 misurazioni a distanza di ≥ 4 ore, conta piastrinica <100 000/ μ l, urina in uscita <500 mL/24 h, edema polmonare o cianosi, ictus e insufficienza renale progressiva. Infine, il termine di eclampsia viene riservato a quei casi che manifestano uno o più attacchi convulsivi, seguiti da perdita di coscienza; rappresenta la manifestazione più grave della gestosi e può essere addirittura causa di morte materna.

I due eventi che sicuramente si associano allo sviluppo della preeclampsia sono l'insufficiente placentazione e il danno endoteliale. (Fig.10)

- *Insufficiente placentazione*: la placenta rappresenta sicuramente il centro focale per tutte le manifestazioni della PE, tanto è vero che l'espletamento del parto (e la conseguente asportazione della placenta) rappresenta l'unica soluzione definitiva al problema. Nella PE l'invasione del citotrofoblasto delle arterie spirali è incompleta perché è limitata alla decidua superficiale e i segmenti miometriali rimangono intatti. Fisher ha anche dimostrato che nel normale

sviluppo placentare il citotrofoblasto assume un fenotipo endoteliale e si ha un processo chiamato pseudovasculogenesi o mimetismo vascolare: si ha una down-regulation delle molecole di adesione caratteristiche del loro fenotipo epiteliale e l'espressione di molecole di superficie tipiche del fenotipo di adesione endoteliale. Nella preeclampsia, i citotrofoblasti non subiscono questo passaggio e quindi non sono in grado di invadere adeguatamente le arterie spirale miometriali [50] [51] [52] [53]. La mancata trasformazione delle arterie spirali è considerata il primum movens della diminuzione della perfusione placentare nella PE, fenomeno questo in grado di condurre alla precoce ipossia placentare. Altre ipotesi chiamano in causa la possibile correlazione tra la PE e le modificazioni della risposta immunitaria all'interfaccia materno-fetale.

Un antigene leucocitario umano, l'antigene leucocitario G (HLA-G), è espresso dal normale tessuto placentare e può rivestire un ruolo importante nel modulare la risposta immune materna verso la placenta, estranea da un punto di vista immunologico (la parte fetale della placenta contiene materiale genetico appartenente al padre). In condizioni fisiologiche, l'HLA-G protegge il trofoblasto dall'azione delle cellule NK (Natural Killer) a livello dell'interfaccia feto-materna.

Nella PE è stato dimostrato un livello più basso dell'antigene HLA-G nel tessuto corionico. I tessuti placentari nelle gravidanze complicate da PE possono esprimere antigeni leucocitari umani G differenti o in misura minore, determinando così la rottura della tolleranza immunitaria materna verso la placenta. Inoltre, nella PE sono stati dimostrati elevati livelli di citochine infiammatorie nella placenta e nel circolo materno così come è stata evidenziata un'aumentata attivazione delle cellule NK e dei neutrofili.

L'insufficienza placentare che ne deriva è responsabile dell'aumento della frequenza di alterazioni aspecifiche a livello placentare, quali:

- aumento del volume e del numero degli infarti placentari;
- aumentata frequenza di formazione di piccoli ematomi retroplacentari (piccoli distacchi di placenta);
- proliferazione citotrofoblastica;
- necrosi dei villi;
- ispessimento della membrana basale del trofoblasto;
- degenerazione fibrinoide della parete delle arteriole deciduali.

- *Danno endoteliale*; molti marcatori sierici di attivazione endoteliale come il fattore di von Willebrand, la fibronectina, il fattore tissutale solubile, l'E-selectina, il fattore di crescita derivato dalle piastrine e l'endotelina sono alterati nelle donne con preeclampsia. L'alterazione della funzione endoteliale è stata correlata con un aumento dello stress ossidativo dovuto ad uno sbilanciamento tra fattori pro-ossidanti e difese antiossidanti. Nella gravidanza normale la placenta si trova già in uno stato di stress ossidativo: l'inadeguata invasione trofoblastica caratteristica della PE, determina un'ischemia relativa o ipossia placentare che esacerba lo stress ossidativo e determina la secrezione di sostanze di origine placentare come i lipidi perossidi, responsabili della conseguente disfunzione endoteliale materna e della comparsa delle manifestazioni cliniche. I lipidi perossidi inoltre, alterano la permeabilità capillare per le proteine e possono essere in parte responsabili dell'edema e della proteinuria; possono poi stimolare i processi trombotici attraverso un aumento della formazione di trombina ed il rilascio dell'inibitore del fattore attivante il plasminogeno, con la contemporanea riduzione dell'antitrombina e del rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno.

Secondo il gruppo di Oxford, un'altra importante causa di danno endoteliale potrebbe essere un maggiore passaggio nel circolo materno di tessuto placentare, in seguito a fenomeni ischemici. L'espulsione di sinciziotrofoblasto nel circolo materno è un fenomeno normale nella gravidanza fisiologica che tuttavia, nella PE aumenta in maniera significativa. Tali microemboli trofoblastici sarebbero in grado di determinare il danno endoteliale diffuso tipico della PE. Inoltre, la liberazione da parte delle cellule immunocompetenti di sostanze ad azione citotossica, in relazione al mancato adattamento immunitario alla gravidanza, contribuisce al danno endoteliale. I neutrofili attivati a livello deciduale rilasciano l'elastasi ed altre proteasi tossiche che distruggono l'integrità dell'endotelio. Nelle gestanti con PE la concentrazione di elastasi plasmatica è significativamente aumentata rispetto alle gravidanze fisiologiche. Infine, i leucociti attivati rappresentano un'importante fonte di radicali liberi dell'ossigeno, a loro volta responsabili dello stress ossidativo delle cellule endoteliali. Quindi la disfunzione endoteliale che caratterizza la PE si manifesta con:

- alterata risposta vascolare agli agenti vasocostrittori quali l'angiotensina II e la norepinefrina che porta ad un quadro di vasocostrizione generalizzata;
- alterata produzione di sostanze ad azione vasoattiva come la prostaciclina (PGI₂), l'ossido nitrico (NO), l'endotelina 1 (ET-1), il trombossano A₂ (TxA₂).

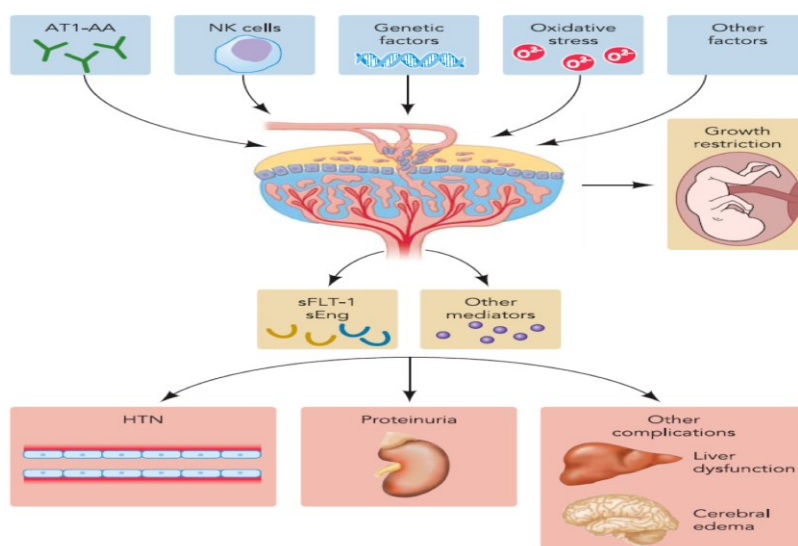


Fig.10-Possibili meccanismi eziopatogenetici della PE
Wang A.
Physiology (Bethesda)2009; 24:147-58

Studi recenti individuano anche nello squilibrio dei fattori angiogenetici un ruolo nella disfunzione endoteliale, soprattutto renale. Le prime anomalie descritte sono state l'incremento di sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosine-kinase 1) e il decremento del PlGF (Placental Growth Factor) e del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il VEGF stabilizza le cellule endoteliali nei vasi sanguigni maturi ed è particolarmente importante nell'endotelio di rene, fegato e cervello (organi che infatti sono coinvolti nella PE). Infatti, il VEGF è altamente espresso da podociti glomerulari e i recettori VEGF sono presenti sulle cellule glomerulari endoteliali. L'sFlt1 è una variante di giunzione troncata del recettore VEGF legato alla membrana Flt1, anche chiamato VEGFR1. Flt1solubile è costituito dal solo dominio extracellulare senza la presenza della parte transmembrana e dei domini di segnalazione intracellulare; in questo modo antagonizza sia VEGF che PlGF, legandoli in circolo e impedendo la loro interazione con i recettori endogeni [51] [54] [55]. (Fig.11) L'espressione placentare di Flt1 solubile è aumentata nella preeclampsia, che quindi aumenta nella circolazione materna. In ultima analisi sia la carenza di VEGF, indotto da anticorpi anti-VEGF o geneticamente determinato, sia l'eccesso di sFlt1, è probabilmente responsabile del danno all'endotelio glomerulare con

conseguente proteinuria. Il ruolo fisiologico di PlGF è meno compreso di quello di VEGF, ma sembra stimolare l'angiogenesi in condizioni di ischemia, infiammazione e guarigione delle ferite e può contribuire all'aterosclerosi. Il PlGF, con omologia strutturale a VEGF-A, è un potente fattore di crescita angiogenico che amplifica la via di segnalazione di VEGF, spostando il VEGF dal recettore Flt1 e permettendogli di legarsi a un recettore più potente. In ratti gravidi, l'inibizione sia di PlGF che di VEGF è necessaria per produrre preeclampsia.

Infine, sono state osservate altre alterazioni dei fattori angiogenici:

- i livelli sierici materni di endostatina, un inibitore dell'angiogenesi, sono elevati;
- l'endoglina s (sEng), una forma troncata di endoglina, che lega e antagonizza il TGF- β (Transforming Growth Factor β) è iperespressa con un modello simile a quello di sFlt.

Come con sFlt1, i livelli circolanti di sEng sono elevati già settimane prima dell'insorgenza della preeclampsia. Il suo ruolo preciso nella preeclampsia e nella relazione con sFlt1 è attualmente in fase di studio [51] [56] [57].

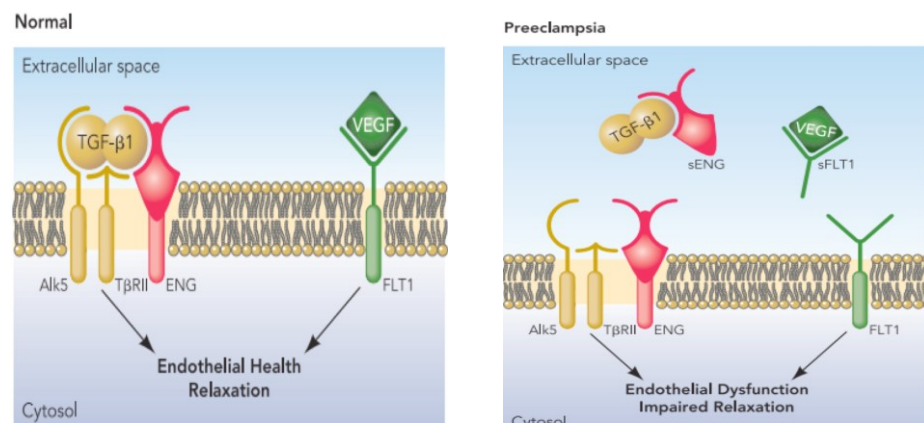


Fig.11-Meccanismo alterato che si attua nella PE.

Wang A. Physiology (Bethesda)2009;24:147-58

Tutte queste alterazioni della funzione endoteliale si manifestano sul piano clinico con la tendenza all'incremento pressorio. L'alterazione della funzione endoteliale, associata alla preponderanza delle sostanze ad azione proaggregante e all'attività trombolastinica dei microemboli trofoblastici

liberatisi dalla placenta, determinano inoltre un quadro di coagulazione intravascolare a lento decorso responsabile delle alterazioni della coagulazione e del diffuso danno d'organo tipico della PE. Le manifestazioni convulsive dell'eclampsia sarebbero anch'esse una conseguenza di fenomeni di coagulazione intravascolare, che si verificherebbero in maniera acuta a livello dei piccoli vasi cerebrali con formazione di microtrombi di fibrina e piastrine ($\uparrow$ fibronectina, beta-tromboglobulina e txA_2 , $\downarrow$ antitrombina III). A seconda del numero e dell'estensione di tali lesioni, nonché dell'entità dello spasmo vascolare che le accompagna, si verificherebbero le manifestazioni convulsive ed il grave coma eclampico. Lesioni secondarie alla formazione di microtrombi fibrinici sono evidenziabili anche a livello del fegato, della milza e dei surreni. Le alterazioni epatiche sono verosimilmente responsabili del dolore epigastrico che compare nelle condizioni di "eclampsia imminente", perché determinano un brusco rigonfiamento del parenchima con tensione della capsula glissoniana. [50].

- *IUGR*; le caratteristiche di questa patologia sono state trattate precedentemente, ma l'aumento del rischio trombotico ad essa associato è dovuto all'insufficienza placentare ad essa sottostante. Normalmente il flusso ematico utero-placentare aumenta in gravidanza soprattutto mediante dilatazione dei vasi interessati, mentre la mancata dilatazione dei vasi utero-placentari è il punto cruciale sia del ridotto accrescimento fetale che della preeclampsia, nonostante esse siano due distinte entità patologiche. Le gravidanze con *IUGR* in media esitano in parti prematuri e presentano tassi più alti di mortalità e di complicanze perinatali; gli esiti a lungo termine contemplano un aumentato rischio di alterazione dello sviluppo neurologico e del ritardo di crescita. In conclusione, i neonati con *IUGR* presentano un rischio più alto di esiti avversi sia nel breve che nel lungo termine, rispetto ai neonati di peso normale per l'epoca gestazionale.

2.3 SCREENING PER LA TROMBOFILIA

La trombofilia è associata ad alterazioni ematologiche, sia congenite che acquisite, che possono essere studiate con dosaggi quantitativi o con tecniche genetiche di biologia molecolare. L'utilità di eseguire indagini di laboratorio per identificare una condizione ereditaria di trombofilia è a tutt'oggi argomento di discussione. Il Gruppo di Studio di Coagulazione della SIPMeL (Società Italiana di Patologia clinica e Medicina di Laboratorio) ha pertanto voluto eseguire una revisione della letteratura scientifica nel particolare ambito dello studio dei polimorfismi nella diagnostica di screening della trombofilia. A distanza di 12 anni risulta ancora del tutto condivisibile quanto sostenuto nelle linee guida del 2004 della SIMeL (Società Italiana di Medicina di Laboratorio), che definiscono:

Soggetti per i quali è indicato eseguire lo screening per la trombofilia:

- Età di comparsa dell'evento trombotico entro la sesta decade;
- Tromboembolismo venoso idiopatico;
- Tromboembolismo venoso ricorrente;
- Trombosi venose superficiali recidivanti;
- Soggetti asintomatici con familiarità positiva per eventi tromboembolici ricorrenti;
- Familiari di primo grado di soggetti portatori di trombofilia eredo-familiare;
- Associazione trombosi/perdita fetale;
- Necrosi cutanea indotta da anticoagulanti orali;
- Porpora fulminante neonatale.

Non c'è indicazione, in ambito di prevenzione, allo svolgimento dello screening in tutta la popolazione generale, per la relativa diffusione di condizioni congenite con minor peso clinico-prognostico, oltre a considerazioni di economia sanitaria.

Si ricorda anche che gli episodi di malattia tromboembolica possono manifestarsi senza causa apparente (idiopatici) o in relazione a condizioni favorevoli. I primi suggeriscono una maggiore "costituzione trombofilica" nel paziente, con una prognosi più delicata, e richiedono un atteggiamento più prudente nei confronti della durata ottimale di una terapia anticoagulante. Per escludere una condizione idiopatica, nella valutazione clinica di ogni episodio di tromboembolismo, vanno pertanto ricercati accuratamente i fattori di rischio persistenti o transitori che possono aver concomitato e contribuito alla sua comparsa.

Tra queste condizioni di rischio vanno ricordati in particolare: immobilizzazione persistente, patologia neoplastica, traumatismo, interventi chirurgici, gravidanza e puerperio, terapia estroprogestinica, tabagismo e obesità.

Test validati per lo screening:

Sui soggetti sopra identificati risultano validati da studi epidemiologici, e pertanto sono consigliati, i seguenti test clinici:

- Test clinici funzionali (o fenotipici), intesi a identificare condizioni congenite:
 - Antitrombina
 - Proteina C
 - Proteina S
 - Resistenza alla proteina C attivata
 - Omocisteina

Il dosaggio dei test funzionali di antitrombina, proteina C e proteina S può evidenziare un continuum nelle variazioni dei livelli di concentrazione. Tutte queste condizioni hanno un peso clinico e prognostico diverso (trombofilia maggiore o minore). [66] Per quanto riguarda l'omocisteina, i cui livelli sono influenzati sia da condizioni genetiche che acquisite (apporto nutrizionale di folati, B6 e B12, funzionalità renale o tiroidea), non c'è accordo su come valutare clinicamente gli incrementi definiti "lievi" o "intermedi" [67].

- Test clinici funzionali, intesi a identificare condizioni acquisite, da eseguire pertanto solo in soggetti che abbiano evidenziato episodi di malattia tromboembolica o patologia ostetrica ad essa riconducibile:
 - Lupus anticoagulant
 - Anticorpi anti-cardiolipina
 - Anticorpi anti-beta2-glicoproteina1

Alcune condizioni cliniche possono interferire con la corretta determinazione dei test funzionali (non di quelli genetici), per cui si raccomanda di NON eseguire lo studio delle indagini fenotipiche (in particolare quelle coagulative) in queste condizioni:

- Durante la fase acuta di un evento trombotico, venoso o arterioso
- Durante la terapia anticoagulante
- Durante malattie intercorrenti acute

- Durante la terapia estroprogestinica
- Durante la gravidanza
- In presenza di enteropatie

➤ Test genetici:

- Ricerca della mutazione G20210A del gene della protrombina;
- Ricerca della mutazione G1691A del gene del fattore V (cosiddetto di Leiden).

La ricerca dei polimorfismi della protrombina e del fattore V può esitare in condizioni di eterozigosi, omozigosi, o combinazioni delle stesse.

Viene confermata, invece, l'inutilità della ricerca dei polimorfismi del gene MTHFR, dovuta alla loro grande diffusione nella popolazione e al fatto che non risultano essere correlati in maniera significativa ad un aumento della omocisteinemia né tantomeno alla insorgenza della malattia tromboembolica venosa [67-68].

La stessa considerazione vale per lo studio dei polimorfismi riguardanti altri enzimi del ciclo metabolico della omocisteina (CBS, metionina sintasi) poiché, in uno studio di screening, è sufficiente individuare la sola espressione fenotipica dei livelli di omocisteinemia ematica.

Ci sono anche altri polimorfismi, da anni oggetto di studi, ma non vi sono ancora conferme epidemiologiche significative e conclusive che consentano di trasferire la loro ricerca nella pratica clinica [69].

L'interpretazione dei risultati di tutti questi esami richiede particolare competenza, pertanto si sottolinea la necessità di avvalersi della consulenza di personale medico esperto, appartenente a centri specialistici.

3. STUDIO presso *SOD clinica di Ostetricia e Ginecologia a prevalente indirizzo ostetrico e gravidanza ad alto rischio Ancona UNIVPM*

3.1 INTRODUZIONE

Le gravidanze gemellari monocoriali sono associate ad un aumentato rischio di morbidità e mortalità fetale, a causa di complicanze correlate alla loro stessa corionicità. [1] Le complicanze più comuni sono la sindrome da trasfusione fetto-fetale (TTTS), la TAPS (Twin Anemia Polycythemia Sequence) il ritardo di crescita selettivo intrauterino (IUGR), e la morte intrauterina fetale di uno o entrambi i gemelli, più frequente rispetto ai gemelli bicoriali. [2-4] La sindrome da trasfusione fetto-fetale si verifica nel 10-20% delle gravidanze monocoriali [5] e viene valutata attraverso la classificazione di Quintero che è di aiuto nella diagnosi e nella pianificazione del trattamento. [6] Descritta per la prima volta nel 1687, la storia naturale e l'eziologia della TTTS è per lo più sconosciuta. E' associata ad un tasso di mortalità che supera il 70% se non trattata [7-8] e allo sviluppo di deficit neurologici nel 10-30% dei gemelli che sopravvivono alla morte intrauterina dell'altro gemello. [9] Molte e differenti strategie di trattamento sono state proposte e messe in pratica, ma la fotocoagulazione laser in fetoscopia, descritta per la prima volta da De Lia e al. nel 1990 [10] è attualmente la terapia di prima scelta. [11] La placenta monocoriale dovrebbe essere considerata una anomalia malformativa dello sviluppo. L'architettura placentare delle anastomosi vascolari inter-gemellari è stata oggetto di numerosi studi, come, ad esempio, quelli sul diametro dei vasi, la loro resistenza e i pattern di flusso Doppler [12].

La trasfusione fetto-fetale si verifica attraverso multiple anastomosi vascolari tra le circolazioni dei gemelli, che determinano così lo sviluppo di una corrente ematica netta da un gemello (donatore) all'altro (ricevente). Tuttavia, l'analisi istopatologica placentare suggerisce la presenza di anastomosi tra le circolazioni gemellari nel 100% delle gravidanze monocoriali, ma la TTTS si verifica in meno del 10% dei casi; questo è probabilmente dovuto al fatto che nella maggioranza dei casi non c'è una presenza rilevante di anastomosi arterovenose. I gemelli monocoriali presentano inoltre un'incidenza di trombosi dei vasi fetali maggiore rispetto ai bicoriali. [13]

Le principali forme di trombofilia su base ereditaria sono attribuibili alla mutazione G1691A del fattore V di Leiden, che può essere in omozigosi o in eterozigosi. La trombofilia è definita come una aumentata tendenza a formare trombi vascolari. Le persone affette da trombofilia

hanno un aumentato rischio di sviluppare complicanze tromboemboliche, come trombosi venosa profonda, embolia polmonare o complicanze cardiovascolari, come ictus o infarto miocardico. Gli stati trombofilici sono stati chiamati in causa in una molteplicità di eventi ostetrici avversi, inclusi l'interruzione di gravidanza (soprattutto la morte fetale), la preeclampsia, neonati piccoli per età gestazionale (SGA) e il distacco intempestivo di placenta [14]. La terapia anticoagulante ha la potenzialità di migliorare gli outcome ostetrici in donne con trombofilia ereditaria [15-16].

Le lesioni placentari maggiormente note nelle donne con trombofilia e esiti della gravidanza avversi sono la trombosi dei vasi fetali, gli infarti, l'ipoplasia, la trombosi delle arterie spirali e la deposizione di fibrina perivillare. [17]

La prevalenza complessiva della trombofilia è di 1 caso su 10 (10%) nella popolazione generale. [18] Nonostante questo, non ci sono dati in letteratura che riguardano la frequenza della trombofilia ereditaria in una popolazione di pazienti con gravidanza moncoriale. Lo scopo di questo studio è di confrontare retrospettivamente la frequenza di fattori ereditari di trombofilia nelle gravidanze gemellari moncoriali biamniotiche, con l'incidenza di comparsa nelle stesse della TTTS.

3.2 PAZIENTI E METODI

Le pazienti con gravidanze gemellari moncoriali biamniotiche che sono state seguite o hanno partorito presso il Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia dell'Università Politecnica delle Marche, dell'Ospedale Salesi (Ancona, Italia) da gennaio 2014 a Marzo 2020, sono state reclutate per uno studio di coorte retrospettivo. Il gruppo di studio è stato poi ulteriormente suddiviso in quelle che hanno, o non hanno (controlli) sviluppato TTTS. La loro documentazione medica è stata poi revisionata per ottenere informazioni di base e sugli esiti perinatali. La loro corionicità è stata determinata in base a criteri ultrasonografici [19-20] e è stata in primis valutata in base alla presenza del segno T nel primo trimestre di gravidanza. Tra i criteri di esclusione sono stati inclusi tutti gli altri tipi di gravidanza gemellare, le gravidanze con anomalie strutturali congenite dei feti rilevate pre o post nascita e le pazienti in terapia anticoagulante. La TTTS è stata definita in accordo agli Eurofetus criteria: polioidramnios (falda massima ≥ 8 cm prima delle 20 settimane gestazionali o ≥ 10 cm dopo le 20 settimane) nel feto ricevente e oligoidramnios (falda massima ≤ 2 cm) nel feto donatore. [21] La stadiazione della TTTS è stata fatta seguendo i criteri di Quintero. [6] A tutte le pazienti reclutate è stato

chiesto di partecipare allo studio attraverso un prelievo di sangue, da fare almeno 6 mesi dopo il termine della gravidanza.

L'attività delle proteine plasmatiche S e C è stata misurata attraverso il test funzionale coagulativo (Instrumentation Laboratory, Milano, Italia) e le misurazioni sono state fatte in donne non gravide e non in terapia ormonale. I cut-off per il deficit sono stati: 76% di attività per la proteina C, 56% di attività per la proteina S. L'acido desossiribonucleico leucocitario è stato ottenuto da sangue congelato attraverso l'uso di tecniche standard. Le portatrici dell'allele del Fattore I (Beta-fibrinogeno), Fattore V (Leiden), Fattore II (Protrombina) e MTHFR (C677T) sono state definite tali in base alla presenza della mutazione allelica sia in omozigosi che in eterozigosi. Il genotipo di nessuna di queste donne era noto prima di questo studio. Il polimorfismo -455G/A del gene del fattore I (Beta fibrinogeno) è stato genotipizzato; il frammento 220 bp (paio di basi) del gene del fattore V che comprende il nucleotide 1691 è stato amplificato tramite PCR (reazione a catena della polimerasi) come precedentemente descritto [22]; per identificare la mutazione G20210A del gene della protrombina un frammento di 345 bp è stato ottenuto e digerito con l'endonucleasi HindIII, in accordo con Poort et al. [23]; un frammento di 198 bp che contiene il polimorfismo C677T del gene dell'MTHFR è stato prodotto come descritto altrove. [24]

Lo studio è stato approvato dall'Istitutional Clinical Research Committee. Le analisi statistiche sono state eseguite con l'SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v. 19.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA). I dati sono rappresentati come medie $\pm$ deviazioni standard (SD) o numeri (in percentuale) e le differenze statistiche tra i gruppi sono state testate con lo Student T-test. Il test del χ^2 è stato utilizzato per valutare le differenze nelle frequenze. I risultati delle analisi genotipiche sono rappresentati come Odds Ratio (OR) o come media delle differenze con il 95% di intervallo di confidenza (CI).

3.3 RISULTATI

E' stato reclutato un totale di 52 pazienti con gravidanze gemellari moncoriali, le caratteristiche dei gruppi con o senza TTTS sono riportate nella tabella 1. Il gruppo delle pazienti con TTS risulta essere equivalente all'altro per età materna, BMI pre-gravidico e frequenza di nulliparità, invece, come previsto, l'età gestazionale al parto e il peso alla nascita risultano essere inferiori nel gruppo con TTTS ($p < 0.001$). La morte fetale di entrambi i gemelli si è verificata più frequentemente nel gruppo TTTS (25% vs 5.5%; $p < 0.05$).

	NO - TTTS (N. = 36)	TTTS (N. = 16)	P <
Maternal age (years)	32.2 ± 3.7	31.7 ± 2.3	N.S.
Pre-pregnancy Body Mass Index	22.8 ± 6.2	23.1 ± 4.7	N.S.
Nulliparous	31 (86.1)	13 (81.2)	N.S.
Assisted reproduction	2 (5.5)	0	N.A.
Gestational age at delivery	33.1 ± 1.1	29.3 ± 3.1	< 0.001
Birthweight larger twin (g)	2106 ± 431	1183 ± 348	< 0.001
Birthweight smaller twin (g)	1923 ± 505	936 ± 377	< 0.001
Cesarean section	34 (94.4)	16 (100)	N.S.
Fetal demise one twin	1 (2.7)	1 (6.2)	N.S.
Fetal demise both twins	2 (5.5)	4 (25)	< 0.05
Quintero Stage I		2 (12.5)	
Quintero Stage II		6 (37.5)	
Quintero Stage III		2 (12.5)	
Quintero Stage IV		2 (12.5)	
Quintero Stage V		4 (25)	

Table 1. Characteristics of study groups. Data are expressed as Mean ± Standard Deviation or N and (%). N.S.: not significant.

Il deficit della proteina S è stato riscontrato in un solo caso nel gruppo TTTS, mentre non ci sono stati casi di deficit di proteina C. Almeno un difetto trombofilico è stato osservato in 7 (43.7%) casi e in 5 (13.8 %) controlli (OR: 4.82; $p < 0.05$). (Tabella 2)

Sono risultate positive per il fattore I (Beta-Fibrinogeno) 11 pazienti (68.7%) del gruppo TTTS e 12 (33.3%) pazienti nei controlli, di cui 10 (62,5%) eterozigoti nel gruppo TTTS versus 11 (30.5%) nei controlli (OR: 3.78; $p < 0,05$). Come minimo un allele mutato per il fattore V di Leiden è stato riscontrato in 4 (25%) pazienti con TTTS e in 1 controllo (2,7%). (OR: 11.66; $p < 0,05$) Le mutazioni della protrombina non risultano essere frequenti in modo significativo,

in quanto si riscontrano solo come eterozigosi, in 4 casi (**25%**) del gruppo TTTS e in un caso (**2,7%**) nei controlli. Nemmeno la differenza di frequenza della mutazione C6777 in omozigosi del MTHFR è statisticamente significativa nei due gruppi.

La coesistenza di almeno due difetti trombofilici risulta presente in 5 (**31,2%**) casi TTTS e in 9 (**25%**) controlli, una differenza che non viene considerata significativa. Nessuna correlazione rilevante è emersa tra disordini trombofilici e stadio di Quintero nei pazienti TTTS.

	NO - TTTS (N. = 36)	TTTS (N. = 16)	OR (95 % CI)	P =
Factor I (Beta-Fibrinogen) homozygous	1 (2.7 %)	1 (6.2%)	2.33 (95 % CI: 0.1367 to 39.8206)	0.558
Factor I (Beta-Fibrinogen) heterozygous	11 (30.5%)	10 (62.5%)	3.78 (95 % CI: 1.1007 to 13.0352)	0.0347*
Any Factor I (Beta-Fibrinogen)	12 (33.3%)	11 (68.7%)	4.4 (95 % CI: 1.2431 to 15.5744 0.0216)	0.0216*
Factor V Leiden homozygous	0	1 (6.2%)	7.06 (95 % CI: 0.2725 to 183.1753)	0.2391
Factor V Leiden heterozygous	1 (2.7%)	3 (18.7%)	8.07 (95 % CI: 0.7695 to 84.7795)	0.2391
Any Factor V Leiden	1 (2.7%)	4 (25%)	11.6667 (95 % CI: 1.1846 to 114.9008)	0.0353*
Factor II (Prothrombin) homozygous	0	0	N.A.	N.A.
Factor II (Prothrombin) heterozygous	1 (2.7%)	4 (25%)	11.66 (95 % CI: 1.1846 to 114.9008)	0.2032
Any Factor II (Prothrombin)	1 (2.7%)	4 (25%)	11.66 (95 % CI: 1.1846 to 114.9008)	0.2032
Protein S deficiency	0	1 (6.2%)	7.06 (95 % CI: 0.2725 to 183.1753)	0.2391
Protein C deficiency	0	0	N.A.	N.A.
MTHFR C6777 homozygous	12 (33.3%)	8 (50%)	2.0 (95 % CI: 0.6022 to 6.6419)	0.2577
At least one defect	5 (13.8%)	7 (43.7%)	4.82 (95 % CI: 1.2294 to 18.9147)	0.0241*
Multiple defects	9 (25%)	5 (31.2%)	1.36 (95 % CI: 0.3721 to 4.9972)	0.6397
Table 2. Numbers, percentage and odds ratios (OR) with their 95% confidence intervals (CI) are given; (*) P< 0.05; N.A.: not applicable.				

3.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le gravidanze monocoriali hanno un più alto rischio di complicanze rispetto alle gravidanze bicoriali perché la maggioranza di queste placenti presenta anastomosi vascolari che connettono le circolazioni dei due feti e attraverso queste anastomosi i gemelli scambiano sangue continuamente. La patogenesi della TTTS rimane tuttavia non completamente compresa, infatti, mentre l'ampia maggioranza delle gravidanze monocoriali biamniotiche presenta anastomosi tra i gemelli, solo una piccola frazione di queste sviluppa TTTS. Le anastomosi arterovenose e venoarteriose permettono solo trasfusioni unidirezionali dal circolo arterioso a quello venoso, al contrario le anastomosi arteroarteriose e venovenose permettono un flusso bidirezionale tra i gemelli a seconda della direzione del gradiente pressorio lungo le anastomosi. Uno squilibrio nel flusso di sangue può portare allo sviluppo della trasfusione fetofetale: una trasfusione da un gemello (il donatore) all'altro (il ricevente) [25], ma la patogenesi di questo squilibrio non è nota.

Ad oggi, questo è il primo report sulla frequenza dei fattori trombofilici ereditari nelle gravidanze gemellari monocoriali e abbiamo riscontrato che almeno un fattore trombofilico è più frequente nella popolazione di pazienti che è andata incontro a TTTS; **in particolare i fattori più frequentemente coinvolti sono stati il fattore I e il fattore V di Leiden**. Questa ipotesi ereditaria potrebbe spiegare perché solo una porzione delle gravidanze monocoriali sviluppa TTTS.

Numerosi articoli focalizzano l'attenzione sulla trombosi dei vasi fetali nella patogenesi delle complicanze delle gravidanze monocoriali. Villi placentari avascolari con occlusione dei vasi fetali sono associati a ritardo di crescita intrauterino e crescita discordante nelle gravidanze con placente monocoriali. [26] L'incidenza documentata di trombosi nei vasi placentari di gravidanze singole è approssimativamente del 10% [27]. L'incidenza della trombosi dei vasi fetali nelle placente monocoriali risulta essere più alta di quella delle placente bicoriali e delle gravidanze singole; inoltre la trombosi dei vasi fetali è associata a crescita fetale discordante e morte di un gemello. [28]

Nelle placente monocoriali è stato documentato che la trombosi delle anastomosi compensatorie può determinare la rapida insorgenza della sindrome da trasfusione fetofetale. [29-30]

Sebbene la trombofilia sia ampiamente studiata per le sue implicazioni nelle complicanze gestazionali, il ruolo dei diversi fattori non è stato completamente chiarito, e neppure è stata data sufficiente rilevanza al peso della trombofilia fetale nell'origine di alcune forme specifiche

di queste complicanze ostetriche. Dato che le trombofilie congenite sono generalmente ereditate in maniera autosomica dominante, il feto ha il 50% di probabilità di ereditare una trombofilia materna, e questo potrebbe spiegare perché non tutte le gravidanze sembrano essere interessate. Nel caso delle gravidanze monooriali entrambi i feti sarebbero portatori del difetto congenito, ereditato perlomeno dalla madre (anche se il padre non è portatore). Il tessuto placentare ha lo stesso genotipo del feto, questo comporta che quando l'unità fetoplacentare è interessata dal difetto genotipico la situazione trombofilica di entrambe le parti (materna e fetale) può coincidere [31]; la conseguenza di ciò è un ridotto sviluppo della architettura placentare vascolare.

La frequenza allelica del C677T MTHFR e del A1298C MTHFR in una popolazione di pazienti con gravidanze singole e vanishing twin è più alta rispetto alla popolazione sana. [32] Sia i disordini della coagulazione fetali che il flusso sanguigno ombelicale alterato potrebbero determinare una vasculopatia trombotica fetale [33]. Sul versante fetale-neonatale, inoltre, la TTTS nei gemelli monozigoti è considerata un fattore di rischio indipendente per ictus arterioso perinatale (OR: 31.2, 95% CI: 2.9 to 340.0) [34].

Almeno un fattore di rischio genetico per la trombofilia (deficit di tipo I della proteina C, fattore V di Leiden, o fattore II G20210A) è stato identificato in metà dei neonati con ictus alla nascita [35-36]. In accordo all'ipotesi di una trombofilia ereditaria, la patologia placentare vascolare potrebbe essere il link fisiopatologico tra la trombofilia congenita, le complicazioni della gravidanza e la trombosi vascolare.

I nostri risultati, anche se con un campione di popolazione limitato, possono incoraggiare lo svolgimento di studi futuri più ampi, volti a esaminare il possibile link tra la trombofilia congenita, la crescita e la funzione dei vasi placentari nelle gravidanze gemellari monooriali. Comprendere i meccanismi che regolano la coagulazione all'interno della placenta sarà molto importante per stabilire possibili opzioni terapeutiche preventive e efficaci, come è stato studiato, per esempio, l'uso dell'eparina a basso peso molecolare o dell'aspirina a basse dosi in altre patologie della gravidanza. [37]

4. BIBLIOGRAFIA

GRAVIDANZA GEMELLARE:

1. G. Pescetto, L. De Cecco, D. Pecorari, N. Ragni “*Ginecologia e Ostetricia*”, Società Editrice Universo.
2. Linee Guida SIGO, AGOI, AGUI.
3. Pison G, D'Addato AV, “*Frequency of twin births in developed countries*” (2006).
4. Linee guida SIEOG Ed. 2015.
5. Twin Res Hum Genet McMullan PF, Norman RJ, Marivate M, “*Pregnancy Induced Hypertension in twin pregnancy*” (1984): British Journal of Obstetrics and Gynecology 91.
6. Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, et al. “*Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations.*” National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal- Fetal Medicine Units. Am J Obstet Gynecol 2000;182: 938–42. 14.
7. Coonrod DV, Hickok DE, Zhu K, Easterling TR, Daling JR. “*Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: A population-based cohort study.*” Obstet Gynecol 1995;85: 645–50.
8. MacKey AR, Berg CJ, King JC, Duran C, Chang J, “*Pregnancy-related mortality among women with multifetal pregnancies*” Obstetrics and Gynecology 2006.
9. Linee guida NICE 2011 “*Multiple pregnancy: the management of twin and triplet pregnancies in the antenatal period*”.
10. “*Clinical Practice guideline. Management of multiple pregnancy*”. Institute of Obstetricians and Gynaecologists, Royal College of Physicians of Ireland and Directorate of Strategy and Clinical Care, Health Service Executive. 2012
11. RCOG “*management of monochorionic twin pregnancy*” 2008.
12. SOGC “*management of twin pregnancies*” 2000.
13. “*Ultrasound in twin pregnancies*”. SOGC clinical practice guideline n 260, 2011
14. “*Management of multiple pregnancy*”. Institute of obstetricians and gynaecologists, Royal college of Physicians of Ireland. Guideline n 14, 2014
15. “*Il monitoraggio ecografico della gravidanza gemellare*”. Raccomandazioni SIEOG, 2011
16. Fusi L, Gordon H.: “*Twin pregnancy complicated by single intrauterine death. Problems and outcome with conservative management*”. (1990) British Journal of Obstetrics and Gynecology 97.
17. Elisabetta Fini, Dott.Pietro Bottone, Dott.ssa Lorella Battini, “*Uso dell'eparina nelle gravidanze a rischio di complicanze trombotiche*” Università di Pisa 2016/17

18. Mastroiacovo P, Castilla EE, Arpino C, Botting B, Cocchi G, Goujard J et al. “*Congenital malformation in twins: an international study*”. Am J MedGenet 1999
19. “*Calculated Risk of Chromosomal abnormalities in Twin Gestations*” J F Rodis et al. Obstet Gynecol. 1990 Dec.
20. Herskind AM, AlmindPedersen D, Christensen K. “*Increased prevalence of congenital Heart defects in monozygotic and dizygotic twins*”. Circulation 2013
21. Roberts D, Gates S, Kilby M, Neilson JP. “*Interventions for twin-twin transfusion syndrome: a Cochrane review*”. UltrasoundObstetGynecol 2008
22. Cabassa P, Fichera A, Prefumo F, et al. “*The use of radiofrequency in the treatment of twin reversed arterial perfusion sequence: a case series and review of the literature*”. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductivebiology 2013
23. Goodnight W, Newman R; Society of Maternal-Fetal Medicine. “*Optimal nutrition for improved twin pregnancy outcome*”. ObstetGynecol 2009.
24. Luke B. “*Nutrition for Multiples*”. ClinObstetGynecol 2015.
25. Picone O. “*Management of uncomplicated dichorionic twin pregnancy*”. J GynecolObstetBiolReprod (Paris) 2009.
26. Salomon LJ, Stirnemann J, Bernard JP, Essaoui M, Chalouhi G, ElSabbagh A et al. “*Prenatal management of uncomplicated monochorionic biamniotic pregnancies*” J GynecolObstetBiolReprod (Paris) 2009
27. Winer N, Caroit Y, Le Vaillant C, Philippe HJ. “*Monoamniotic twins: diagnosis and management*”. J GynecolObstetBiolReprod 2009
28. NICE ClinicalGuidelines: “*Evidence updated 37 march 2013: Multiple pregnancy*”.
29. American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine. ACOG 2014
30. Barrett JF, Hannah ME, Hutton EK, Willan AR, Allen AC, Armson BA et al. “*A randomized trial of planned cesarean or vaginal delivery for twin pregnancy*”. N Engl J Med 2013
31. Taylor M, Rebarber A, Saltzman DH, Klauser CK, Roman AS, Fox NS. “*Induction of labor in twin compared with singleton pregnancies*”. ObstetGynecol. 2012
32. www.salute.gov
33. Pinborg A. “*IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention*”. HumReprod Update. 2005
34. Borghi C, Esposti DD, Immordino V, Cassani A, Boschi S, Bovicelli L, Ambrosioni E. “*Relationship of systemic hemodynamics, left ventricular structure and function, and plasma natriuretic peptide concentrations during pregnancy complicated by preeclampsia*”. Am J ObstetGynecol 2000; 183:140–147

35. “*Weight gain during pregnancy.*” Committee Opinion No. 548. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2013; 121:210–2.
36. Tollenaar LS, Slaghekke F, Middeldorp JM, et al. “*Twin Anemia Polycythemia Sequence: Current Views on Pathogenesis, Diagnostic Criteria, Perinatal Management, and Outcome.*” *Twin Res Hum Genet.* 2016;19(3):222-233. doi:10.1017/thg.2016.18

- TROMBOFILIA:** Elisabetta Fini, Dott.Pietro Bottone, Dott.ssa Lorella Battini, “Uso dell'eparina nelle gravidanze a rischio di complicanze trombotiche” Università di Pisa 2016/17

37. De Stefano V., Chiusolo P., “*Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications,*” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol.24, n°4, 1998, pp.367–79
38. Bertina RM, Koeleman BP, et al., “*Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*”, *Nature*, vol.369, n°6475, maggio 1994, pp.64–7
39. De Stefano V, Leone G, “*Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia*”, *Haematologica*, vol.80, n°4, 1995, pp.344-56
40. Fauci AS, ed al., “*Venous Thrombosis*”, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17^a ed., McGraw-Hill, 2008, p.732
41. Lockwood JC, “*Heritable coagulopathies in pregnancy*”, *Obstet Gynecol Surv* 1999, 54:754
42. http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=743&lng=IT
43. http://www.cdi.it/it/educational/esami_laboratorio_it/M/MTHFR.html
44. <http://biomolecular-lab.it/prodotto/pai-1-inibitore-1-dellattivatore-delplasminogeno-4g5g/>
45. <http://www.humanitas.it/malattie/sindrome-da-anticorpi-anti-fosfolipidi-aps>
46. Moussa HN., Arian SE et al., “*Management of Hypertensive Disorders in Pregnancy*”, *Women's Health*, Jul;10(4):385-404
47. Hauth JC, Ewell MG et al., “*Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group*”. ,*Obste Gynecol* 2000; 96: 24-28
48. Berg CJ, Chang J, et al., “*Pregancy-related mortality in the USA 1991-1997*”, *Obstet Gynecol* 2003; 101: 289-294
49. Funai EF, Friedlander Y et al., “*Long term mortality after preeclampsia*”, *Epidemiology* 2005; 16: 206-215
50. AA.VV., “*Dispensa ostetricia*”, Collana medicina, Edizioni il Campano, pp. 106-115
51. Wang A., Rana S. et al., “*Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis*”, *Bethesda, Phisiology* Vol.24, 2009, pp.149-56

52. Tammella T., Enholm B. et al., "*The biology of Vascular Endothelial Growth Factors*", Cardiovascular Research, Volume 65, Issue 3, 15 February 2005, Pages 550–563
53. Zhou Y, Fisher SJ et al., "*Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?*", J Clin Invest 99: 2139–2151, 1997
54. Ahmad S., Ahmed A., "*Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia*", Circ Res 95: 884–891, 2004
55. Maynard SE, Min JY et al., "*Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*", J Clin Invest 111: 649–658, 2003
56. Sugimoto H., Hamano Y. et al. , "*Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria*", J Biol Chem 278: 12605–12608, 2003
57. Levine RJ, Lam C. et al., "*Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia*", N Engl J Med 355: 992–1005, 2006
58. Cunningham FG, Leveno KJ et al., "*Fetal growth restriction*", Williams Obstetrics 20th ed. Stamford, Conn.: Appleton & Lange, 1997:839–54
59. Miller J, Turan S, et al., "*Fetal growth restriction*", Semin Perinatol 2008;32:274-80
60. Resnik R., "*Intrauterine growth restriction*", Obstet Gynecol 2002;99:490-6
61. <http://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ematologia-e-oncologia/malattie-trombotiche/deficit-di-proteina-c>
62. "*Gli screening per trombofilia*" S. Testa, G. Antonucci, E. Intra, G. Martini, S. Pedrini, A. Alatri, R. Bader, F. Manzato per il Gruppo di Studio Coagulazione SIMeL
63. Bai J, Ding X, Du X, Zhao X, Wang Z, Ma Z. "*Diabetes is associated with increased risk of venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis.*" Thromb Res. 2015;135(1):90-95. doi:10.1016/j.thromres.2014.11.003
64. González González NL, González Dávila E, Goya M, et al. "*Twin pregnancy among women with pregestational type 1 or type 2 diabetes mellitus.*" Int J Gynaecol Obstet. 2014;126(1):83-87. doi:10.1016/j.ijgo.2014.01.022
65. Livio Zanoio, Eliana Barcellona, Gabrio Zacchè "*Ginecologia e Ostetricia*" Edra Edizioni

SCREENING TROMBOFILIA: “Linee Guida SIPMeL per la ricerca dei Polimorfismi nella Diagnostica di Screening della Trombofilia” Michele Bertini et al., La rivista italiana della Medicina di Laboratorio

66. De Stefano, Rossi E (2016) “*Thrombophilia and risk of recurrent venous thromboembolism*.” XXIV National Congress of the Italian Society for Thrombosis and Hemostasis (SISSET). Blood Trasfus 14 Suppl 5: 663-667
67. Eldibany MM, Caprini JA (2007) “*Hyperhomocysteinemia and thrombosis: An overview*.” Arch Pathol Lab Med 131:872-884
68. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL et al (2007) “*No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: Results from the MEGA study*.” Arch Intern Med 167:497-501
69. Franchini M, Martinelli I, Mannucci PM (2016) “*Uncertain thrombophilia markers*.” Thromb Haemost 115:25-30

STUDIO:

1. Kilby MD, Bricker L, on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists “*Management of monochorionic twin pregnancy*”. BJOG 2016;124:e1-e45
2. Moldenhauer J, Johnson M. “*Diagnosis and management of complicated monochorionic twins*.” Clin Obstet Gynecol 2015;58:632-42
3. Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. “*The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies*.” Br J Obstet Gynecol 1997;104:1203-7
4. Hillman S, Morris R, Kilby M. “*Co-twin prognosis after single fetal death: a systematic review and meta-analysis*.” Obstet Gynecol 2011;118:928-40
5. Habli M, Lim FY, Crombleholme T. “*Twin-to-twin transfusion syndrome: a comprehensive update*.” Clin Perinatol 2009;36:391-416
6. Quintero RA, Morales WJ, Allen MH, Bornick PW, Johnson PK, Kruger M. “*Staging of twin-twin transfusion syndrome*.” J Perinatol. 1999;19:550-555
7. Lewi L, Janu J, Blickstein I, Huber A, Gucciardo L, Van Mieghem T, Doné E, Boes AS, Hecher K, Gratacós E, Lewi P, Deprest J. “*The outcome of monochorionic diamniotic twin gestations in the era of invasive fetal therapy: a prospective cohort study*.” Am J Obstet Gynecol 2008;199:514.e1-514.e8
8. Smith RP, Denbow ML. “*Twin-to-twin transfusion syndrome*.” Obstet Gynaecol 2006;8:1-6

9. O'Donoghue K, Rutherford MA, Engineer N, Wimalasundera RC, Cowan FM, Fisk NM. *"Transfusional fetal complications after single intrauterine death in monochorionic multiple pregnancy are reduced but not prevented by vascular occlusion"*. BJOG 2009;116:804-812
10. De Lia JE, Cruikshank DP, Keye Jr WR. Fetoscopic neodymium: "YAG laser occlusion of placental vessels in severe twin-twin transfusion syndrome." Obstet Gynecol 1990;75:1046-53
11. Simpson LL. *"Twin-twin transfusion syndrome."* AJOG 2013;208:3-18
12. Denbow ML, Cox P, Taylor M, Hammal DM, Fisk NM. *"Placental angioarchitecture in monochorionic twin pregnancies: relationship to fetal growth, fetofetal transfusion syndrome, and pregnancy outcome."* Am J Obstet Gynecol 2000;182:417e26
13. Chan MP, Hecht JL, Kane SE. *"Incidence and clinicopathologic correlation of fetal vessel thrombosis in mono- and dichorionic twin placentas."* J Perinatol 2010;30:660-4
14. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GDO, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA. *"Thrombophilia in pregnancy: a systematic review."* Br J Haematol 2005;132:171-96
15. Brenner B, Hoffman R, Carp H, Dulitsky M, Younis J, for the LIVE-ENOX investigators. *"Efficacy and safety of two doses of enoxaparin in women with thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the LIVE-ENOX study."* J Thromb Haemost 2005;3:227-9
16. Gris JC, Mercier E, Quere I, et al. *"Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder."* Blood 2004;103:3695-9
17. Kupferminc MJ. *"Thrombophilia and pregnancy."* Curr Pharm Des 2005;11:735-48
18. Rodger M, Betancourt M, Clark P, et al. *"The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies"*. PLoS Med 2010;7:e1000292
19. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. *"The lambda sign at 10–14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies."* Ultrasound Obstet Gynecol 1996;7:421-3
20. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Kalogeropoulos A, Nicolaides KH. *"Evolution of the lambda or twin-chorionic peak sign in dichorionic twin pregnancies."* Obstet Gynecol 1997;89:439-41
21. Senat MV, Deprest J, Boulvain M, Paupe A, Winer N, Ville Y. *"Endoscopic laser surgery versus serial amnioreduction for severe twin-to-twin transfusion syndrome."* N Engl J Med 2004;351:136-44

22. Koeleman BP, Reitsma PH, Allart CF, Bertina RM. "*Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C deficient families.*" Blood 1994;84:1031-5
23. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. "*A common genetic variation in the 30-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.*" Blood 1996;88:3698-703
24. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. "*A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.*" Nat Genet 1995;10:111-3
25. Lewi L, Deprest J, Hecher K. "*The vascular anastomoses in monochorionic twin pregnancies and their clinical consequences.*" Am J Obstet Gynecol 2013;208:19-30
26. Redline RW, Shah D, Sakar H, Schluchter M, Salvator A. "*Placental lesions associated with abnormal growth in twins.*" Pediatr Dev Pathol. 2001;4:473-481
27. Evers IM, Nikkels PGJ, Sikkema JM, Visser GHA. "*Placental pathology in woman with type 1 diabetes and in a control group with normal and large-for-gestational-age infants.*" Placenta 2003;24:819-25
28. Sato Y, Benirschke K. "*Increased Prevalence of Fetal Thrombi in Monochorionic-Twin Placentas.*" Pediatrics 2006;117:e113-7
29. Van den Wijngaard JPHM, Ross MG, van Gemert MJC. "*Thrombosis of Anastomoses May Affect the Staging Sequence of Twin-Twin Transfusion Syndrome.*" Phys Med Biol 2008;53:N69-80
30. Nikkels PGJ, van Gemert MJC, Solлие-Szarynska KM, Molendijk H, Timmer B, and Machin GA. "*Rapid Onset of Severe Twin-Twin Transfusion Syndrome Caused by Placental Venous Thrombosis.*" Pediatr Dev Pathol 2002;5:310-4
31. Tranquilli AL, Saccucci F, Giannubilo SR, Cecati M, Nocchi L, Lorenzi S, Emanuelli M. "*Unexplained Fetal Loss: The Fetal Side of Thrombophilia.*" Fertil Steril 2010;94:378-80
32. Ozek MA, Karaagaoglu E, Orgul G, Gumruk F, Yurdakök M, Beksac MS. "*Comparison of Different Types of Twin Pregnancies in Terms of Obstetric and Perinatal Outcomes: Association of Vanished Twins With Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphism(s).*" J Assist Reprod Genet 2018;35:2149-2154
33. Leistra-Leistra MJ, Timmer A, van Spronsen FJ, Geven WB, van der Meer J, Erwich JJ. "*Fetal thrombotic vasculopathy in the placenta: a thrombophilic connection between pregnancy complications and neonatal thrombosis?*" Placenta 2004; 25:S102–S105

34. Benders MJNL, Groenendaal F, Uiterwaal CSPM, Nikkels PGJ, Bruinse HW, Nievelstein RAJ, de Vries LS." *Maternal and Infant Characteristics Associated With Perinatal Arterial Stroke in the Preterm Infant.* " Stroke 2007;38:1759-65
35. Gunther G, Junker R, Strater R, Schobess R, Kurnik K, Heller C, Kosch A, Nowak-Göttl U, Childhood Stroke Study Group. "Symptomatic ischemic stroke in full term neonates: Role of acquired and genetic prothrombotic risk factors." Stroke 2000;31:2437-41
36. Curry CJ, Bhullar S, Holmes J, Delozier CD, Roeder ER, Hutchison HT. "Risk factors for perinatal arterial stroke: A study of 60 mother-child pairs." Pediatr Neurol 2007;37:99-107
37. Greer IA, Brenner B, Gris JC. "Antithrombotic Treatment for Pregnancy Complications: Which Path for the Journey to Precision Medicine?" Br J Haematol 2014;165:585-99