

## Trombofilia in gravidanza: polimorfismi MTHFR, CBS, ACE e GpIIIa, nostra esperienza.

V. RAGUCCI, C. DI SERIO, MARCELLO DI SERIO, MAURIZIO DI SERIO,  
I. PICCIRILLO, G. DANZI, A. TOLINO

**RIASSUNTO:** Trombofilia in gravidanza: polimorfismi MTHFR, CBS, ACE e GpIIIa, nostra esperienza.

V. RAGUCCI, C. DI SERIO, MARCELLO DI SERIO, MAURIZIO DI SERIO,  
I. PICCIRILLO, G. DANZI, A. TOLINO

*Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'incidenza di mutazioni geniche predisponenti alla trombofilia in donne con gravidanze complicate da pre-eclampsia, minaccia di parto prematuro, minaccia di aborto, oltre che in donne positive per abortività ripetuta, prestando particolare attenzione ai fattori MTHFR, GpIIIa, ACE e CBS. Al momento dell'arruolamento nello studio ogni donna è stata sottoposta ad uno screening specifico per l'identificazione di 12 mutazioni dei fattori della coagulazione: Fattore V Leiden (R506O); Fattore V Leiden (H1299R); Fattore II (G20210A); MTHFR (C677T); MTHFR (A1298C); CBS; PAI 1; CETP (I405V); GP IIIa (PIa2); ACE; AGT; ApoE. Quello che si è cercato di mettere in evidenza è come alcune mutazioni genetiche, essendo relativamente comuni, possono essere definite come semplici polimorfismi ma, se associati tra loro o combinati con specifiche componenti ambientali, possono elevare notevolmente lo sviluppo di patologie. Non c'è dubbio sulla "non convenienza" di uno screening di massa per identificare i soggetti a rischio di trombofilia ereditaria, ma certamente trova giustificazione, indipendentemente dal costo, su pazienti selezionate e che presentano evidenti fattori di rischio per patologia trombo-embolica.*

**SUMMARY:** Thrombophilia in pregnancy: polymorphisms MTHFR, CBS, ACE and GpIIIa, our experience.

V. RAGUCCI, C. DI SERIO, MARCELLO DI SERIO, MAURIZIO DI SERIO,  
I. PICCIRILLO, G. DANZI, A. TOLINO

*The aim of our study was to evaluate the incidence of genetic mutations predisposed to thrombophilia in women with pregnancies complicated by pre-eclampsia, threat of premature delivery, threat of abortion and in women positive for repeated abortions, paying special attention to the MTHFR, GpIIIa, ACE and CBS factors. Upon recruitment, each patient was subjected to a specific screening for identification of 12 coagulation factor mutations: Fattore V Leiden (R506O); Fattore V Leiden (H1299R); Fattore II (G20210A); MTHFR (C677T); MTHFR (A1298C); CBS; PAI 1; CETP (I405V); GP IIIa (PIa2); ACE; AGT; ApoE. It has attempted to evidence that some genetic mutations, being relatively common, can be as definite as simple polymorphisms but, if associated or combined with specific environmental components, they can considerably raise the development in pathology. There is no doubt about the "not advantage" of one mass screening to identify the hereditary thrombophilia risk subjects, but certainly finds justification, independently of the cost, on selected patients and what clear risk factors have for thrombo-embolic pathology.*

**KEY WORDS:** Trombofilia - Mutazione dei fattori della coagulazione - Pre-eclampsia - Minaccia di parto prematuro  
Minaccia di aborto - Abortività ripetuta.

Thrombophilia - Mutation of the factors of the coagulation - Pre-eclampsia - Threatens with premature childbirth - Threatens with abortion - Repeated abortivity.

### Introduzione

La *trombofilia* è una condizione patologica di aumentato rischio trombotico, come conseguenza di una eccessiva coagulabilità del sangue.

La maggior parte delle alterazioni trombofiliche, oggi note, sono *congenite*, ossia trasmissibili da genitori a figli. Non si tratta di malattie, ma di condizioni che predispongono alla trombosi.

Un tipo diverso di alterazione trombofilica è costituita dalla *trombofilia acquisita* - compare durante il

corso della vita e non è trasmissibile geneticamente.

La *trombofilia ereditaria* è caratterizzata da una trasmissione genetica autosomica dominante; episodi di trombosi prevalentemente venosa, di solito in assenza di fattori di rischio, con un esordio in età giovanile ed un'elevata tendenza a recidivare; episodi di abortività ripetuta e/o feti nati morti.

Nella maggior parte dei casi si tratta di difetti o alterazioni di uno o più fattori della coagulazione del sangue.

I geni, oggi noti, di suscettibilità alla trombosi, sono delle varianti geniche che presentano una frequenza nella popolazione tale da essere considerate delle varianti polimorfiche. Sono stati descritti numerosi polimorfismi genici associati a trombosi riguardanti i *fattori pro-coagulanti* quali fattore II (protrombina), fattore V, fattore VII, fattore IX, fattore XIII.

Dal punto di vista della trasmissione genetica, la maggior parte dei difetti trombofilici si presentano in forma eterozigote e si trasmettono con modalità autosomica dominante a penetranza incompleta.

Le persone affette hanno una possibilità su due di trasmettere la predisposizione alla malattia ai figli, indipendentemente dal sesso.

Si stima che in Italia il numero di individui omozigoti per il fattore V Leiden sia 1 su 4.000 - 5.000 e, in tale condizione, il rischio di trombosi venosa è di circa 11 volte superiore rispetto a quello di un individuo eterozigote e di 90 volte rispetto a un individuo con genotipo normale.

L'individuo omozigote ha, inoltre, una probabilità circa doppia - rispetto all'eterozigote - di andare incontro ad un episodio clinicamente rilevante di trombosi venosa, prima del trentacinquesimo anno di età (Tab. 1).

## Gravidanza: profilo emocoagulativo

### Modificazioni fisiologiche

La gravidanza comporta una serie di modificazioni che interessano il sistema circolatorio, il profilo emocoagulativo, il volume e la composizione del sangue.

Un incremento del *volume plasmatico* del 15% è evidente già alla 6° settimana di gestazione. Successivamente (28° - 30° settimana) si verifica un ulteriore aumento pari al 30-50%. L'aumento massimo è raggiunto verso la 34° settimana, con un aumento pari, o anche superiore, al 50%, tale da raggiungere i 4000 - 6000 ml di plasma.

Il *numero dei globuli rossi* subisce un aumento solo del 15-20%, cosicché il rapporto globuli rossi/plasma (ematocrito) tende a diminuire. Questo comporta una situazione descritta come "*anemia fisiologica della gravidanza*", con valori di emoglobina che da circa 12 g/dl possono scendere a un minimo normale in gravidanza di 10,5 g/dl.

La *viscosità* si riduce approssimativamente del 20%. Probabilmente tale riduzione fa sì che cali il rischio di trombosi intervillosa e di infarcimento, quindi l'emodiluzione potrebbe rappresentare un fattore protettivo per il letto vascolare utero-placentare.

L'aumento del volume plasmatico è dovuto agli *estrogeni* che incrementano l'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone ed al *progesterone*, che aumenta la produzione di aldosterone.

In tal modo, la funzione dei tubuli renali - inibita dal trattenere sodio - fa aumentare la diuresi, cui segue ipovolemia che determina un aumento di renina al fine di ripristinare un normale volume ematico.

I cambiamenti *emo-coagulativi*, invece, riguardano il fattore I (fibrinogeno), aumentato del 20-30% alla fine del 3° trimestre e del 100% al termine della gravidanza; i fattori VII, VIII e IX che aumentano del 100%; i fattori X e XII che aumentano solo del 30%; il fattore II (protrombina) ed il fattore V che mantengono invariata la loro concentrazione; i fattori XI e XIII che si riducono del 40-50%. Un'elevata *deposizione di fibrina*, che coinvolge presumibilmente la circolazione utero-placentare, è evidente sin dal 2° mese di gestazione e aumenta progressivamente fino al termine della gravidanza.

Il significato fisiologico di questa variazione non indica un reale stato di "ipercoagulabilità", bensì come meccanismo "difensivo" della gravidanza in cui la coagulazione risulta più rapida ed efficace.

Il *sistema fibrinolitico*, invece, appare solo moderatamente aumentato.

Anche la *concentrazione delle proteine sieriche* subisce una riduzione pari al 10% circa, soprattutto nel primo trimestre, dovuta - per lo più - alla riduzione della concentrazione dell'albumina che, al termine della gravidanza, risulta ridotta del 20-25%.

Dopo circa otto settimane dal parto i valori del volume ematico ritornano poi alla normalità.

L'aumentato volume ematico assolve a diverse funzioni:

- sopperisce all'aumentata necessità ematica di un utero più grande;
- colma la crescente riserva venosa;
- protegge le partorienti dalle perdite di sangue al momento del parto;
- protegge dall'ipercoagulabilità durante la progressione della gestazione.

L'*ipervolemia* fisiologica nelle ultime settimane di gestazione rappresenta una specie di riserva protettiva naturale, che consente a una gestante sana di perdere fino a un litro di sangue senza evidenti modifiche di pressione arteriosa e di frequenza cardiaca.

### Trombofilia e gravidanza (Tab. 2)

Nella gravida affetta da trombofilia eredo-familiare

TABELLA 1 - PREVALENZA DEI DISORDINI TROMBOFILICI CONGENITI ED ACQUISITI.

DISORDINE	DIFETTO	% POPOLAZIONE GENERALE	% PZ CON TVP	RISCHIO TVP (OR)
<b>CONGENITI</b>				
AT III	Ridotta inattivazione della trombina e di altri enzimi	0,07	1	10-20
Deficit Proteina C	Ridotta inattivazione del FVa e FVIIIa	0,3	3	6-8
Deficit Proteina S	Ridotta inattivazione del FVa e FVIIIa	0,2	3	2-6
Fattore V di Leiden (Etero)	Ridotta inattivazione FVa da prot C attivata	5-8	20	4-8
Fattore V Leiden (Omo)	Ridotta inattivazione FVa da prot C attivata	0,06	1,5	80
Mutazione gene protrombina (G20210A)	Aumentati livelli di protrombina e trombina	3	6	2-4
Iperomocisteinemia	Danno endoteliale ed effetti pro-coagulanti	5	10	2-3
Omozigosi MTHFR C677T	Ridotta rimetilazione dell'omocisteina	10-20	11-12	0,7-2
<b>ACQUISITI</b>				
Anticorpi antifosfolipidi	Alterato pathway Proteina C, perdita di Annessina V, effetti pro-coagulanti	2	10-15	9
Resistenza alla prot. C attivata acquisita	Ridotta attività anticoagulante	8-11	24	2-4

la maggiore coagulabilità del sangue materno favorisce eventi trombotici principalmente a livello del distretto placentare.

La riduzione anatomo - funzionale del letto placentare, infatti, è tra le cause delle complicazioni acute o croniche della gravidanza.

La gestante con trombofilia è a rischio dei seguenti eventi ostetrici avversi:

- insufficienza placentare cronica (IUGR)
- insufficienza placentare acuta

- morte endouterina fetale
- distacco intempestivo di placenta
- pre-eclampsia (da lieve a severa)
- aborto spontaneo
- aborti ricorrenti

Secondo le linee guida le indagini di laboratorio per individuare i fattori di rischio di trombosi si dividono in **test di I livello** (emocromo completo; anticorpi anticardiolipina; lupus anticoagulant; omocisteinemia; valutazione funzionale resistenza alla proteina C attiva-

TABELLA 2 - CORRELAZIONE TRA PATOLOGIA GRAVIDICA E DIFETTI TROMBOFILICI.

	ABORTO	MEF	PRE-ECLAMPSIA	DISTACCO DI PLACENTA
Deficit AT III	++	++	+	
Deficit Proteina C	++	++	+	+
Deficit Proteina S	++	++	+	+
Disfibrinogenemia	++	+		
Resistenza alla Proteina C	++	++	++	+
Fattore V di Leiden	++	++	++	++
MTHFR (C677T)	+	+	+	+
Iperomocisteinemia	+	+	++	++
Protrombina (G20210A)	+	+	+	++
Sindrome antifosfolipidi	++	++	++	++
Difetti combinati	++	++	++	++

+ = Possibile associazione ++ = Associazione stabilita

ta o analisi del DNA per il fattore V di Leiden; analisi del DNA per la mutazione genica della protrombina); **test di II livello** (valutazione funzionale AT III, valutazione funzionale proteina C, valutazione funzionale o immunologica della proteina S), **test di III livello**, nei casi in cui c'è forte indicazione di familiarità per trombosi o ci sia mancata diagnosi ai test di I e II livello (livelli di fibrinogeno, fattore VIII, e tempo di protrombina); **test IV livello** - ricerca - (analisi del DNA per la mut. C667T di MTHFR, livelli dei fattori V, VII, IX, X, XI, analisi del polimorfismo del PAI, livelli di plasminogeno, livelli di trombo modulina, livelli di attivazione tissutale del plasminogeno, livelli di eparina - cofattore II).

## Materiali e metodi

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'incidenza delle principali mutazioni geniche dei fattori della coagulazione in donne con gravidanze complicate da pre-eclampsia, minaccia di parto prematuro, minaccia di aborto, oltre che in donne positive per abortività ripetuta.

Lo studio, condotto dal marzo 2007 al maggio 2009, è stato effettuato su un campione di 224 gravide seguite presso il *Dipartimento di Emergenza Ostetrica e Gineco-*

*logica, Medicina della Riproduzione e Urologia* del Policlinico Universitario "Federico II" di Napoli, in collaborazione col *Dipartimento di Ginecologia ed Ostetrica* ed il *Laboratorio di analisi* dell'Ospedale "S. Giuseppe Moscati" di Aversa.

Il campione in esame risulta così costituito: 64 donne affette da pre-eclampsia; 40 da minaccia di parto pretermine; 32 da minaccia di aborto e 88 positive per poliabortività.

L'*ipertensione gestazionale* è stata definita in base alla presenza di valori di pressione pari a 140/90 mmHg in due rilevazioni successive a partire dalla ventesima settimana di gestazione.

La diagnosi di *pre-eclampsia*, invece, è stata effettuata in presenza di pressione arteriosa superiore o uguale a 140/90 mmHg e di un'escrezione di almeno 3 gr di proteine nelle urine delle 24h.

I criteri di inclusione sono stati: *età compresa tra i 25 e i 35 anni; non fumatrici; non uso di anticoncezionali da almeno un anno; negative per obesità, diabete e ipertensione essenziale; negative per pregressi interventi chirurgici sulla sfera genitale (miomectomie, endometriosi, metroplastica, etc.); negative per infezioni sessualmente trasmesse; negative per malattie autoimmuni.*

Al momento dell'arruolamento nello studio ogni donna è stata sottoposta ad uno screening specifico per l'i-

TABELLA 3 - INCIDENZA DELLE 12 MUTAZIONI GENETICHE DEI FATTORI DELLA COAGULAZIONE IN TUTTO IL CAMPIONE DA NOI ESAMINATO.

Mutazione	%
Fattore V (R506O)	5,56
Fattore V (H1299R)	16,65
Fattore II (G20210A)	22,22
MTHFR (C677T)	75,17
MTHFR (A1298C)	33,35
CBS	66,65
PAI 1	25
CETP (I405V)	22,22
GP IIIa (Pla2)	36,11
ACE	69,43
AGT	13,87
Apo E	8,35

identificazione di 12 mutazioni dei fattori della coagulazione: *Fattore V Leiden (R506O)*; *Fattore V Leiden (H1299R)*; *Fattore II (G20210A)*; *MTHFR (C677T)*; *MTHFR (A1298C)*; *CBS*; *PAI 1*; *CETP(I405V)*; *GP IIIa (Pla2)*; *ACE*; *AGT*; *ApoE*.

Di particolare interesse sono risultate le mutazioni *MTHFR (C677T)* (75,17%); *CBS* (66,65%); *GP IIIa* (36,11%) ed *ACE* (69,43%) (Tab. 3).

Il test si basa sul principio dell'ibridizzazione inversa e comprende tre fasi successive:

1. isolamento del DNA da sangue non coagulato;
2. amplificazione simultanea dei geni rilevanti nella regione di interesse e marcatura terminale con biotina dei frammenti amplificati;
3. ibridazione su strip dei frammenti amplificati biotinilati con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche.

## Risultati

Nel gruppo delle 64 donne che presentavano **pre-eclampsia** si è osservato che le mutazioni più frequenti

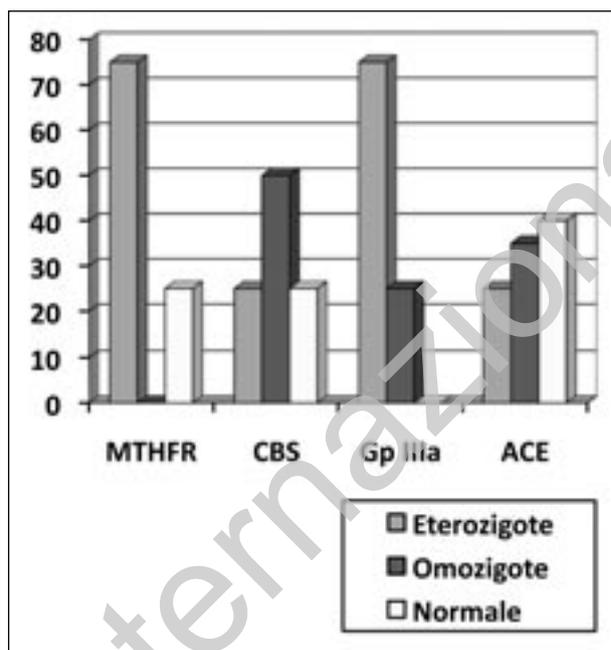


Figura 1 - Pre-Eclampsia

in eterozigosi sono state quelle C677T di MTHFR (75%) ed il polimorfismo Pla2 di GP IIIa (75%); in omozigosi, invece, la delezione di CBS (50%) e di ACE (35%) sono state le più espresse, mentre solo nel 25% dei casi si è osservato il polimorfismo Pla2 di GP IIIa in omozigosi (Fig. 1).

Nel gruppo delle 40 donne con minaccia di parto pretermine la percentuale in eterozigosi dei geni considerati è stata: 100% per il polimorfismo Pla2 GP IIIa; 80% delezione dell'ACE; 60% MTHFR C677T; 40% delezione CBS. Per quanto riguarda le mutazioni in omozigosi, la più rappresentata è stata la delezione di CBS (60%), mentre sia la delezione dell'ACE che MTHFR C677T sono risultate nel 20% dei casi (Fig. 2).

Nel gruppo dei 32 casi di minaccia di aborto le percentuali delle mutazioni in eterozigosi e omozigosi si sono invece presentate equamente distribuite: delezione del CBS, polimorfismo Pla2 GP IIIa e C677T MTHFR nel 50% dei casi, sia in eterozigosi che in omozigosi; mentre la delezione dell'ACE è risultata nel 75% in omozigosi e solo nel 25% in eterozigosi (Fig. 3).

Infine, anche tra le 88 donne positive per poliabortività, le mutazioni dei quattro geni analizzati hanno mantenuto un'alta frequenza, presentandosi quasi con la stessa percentuale in omozigosi o eterozigosi: MTHFR C677T 40%, sia in eterozigosi, che in omozigosi; delezione CBS nel 55% dei casi in eterozigosi e 35% in omozigosi; polimorfismo Pla2 GP IIIa nel 45% dei casi in eterozigosi e 50% in omozigosi; delezione ACE nel 48% dei casi in eterozigosi e 52% in omozigosi (Fig. 4).

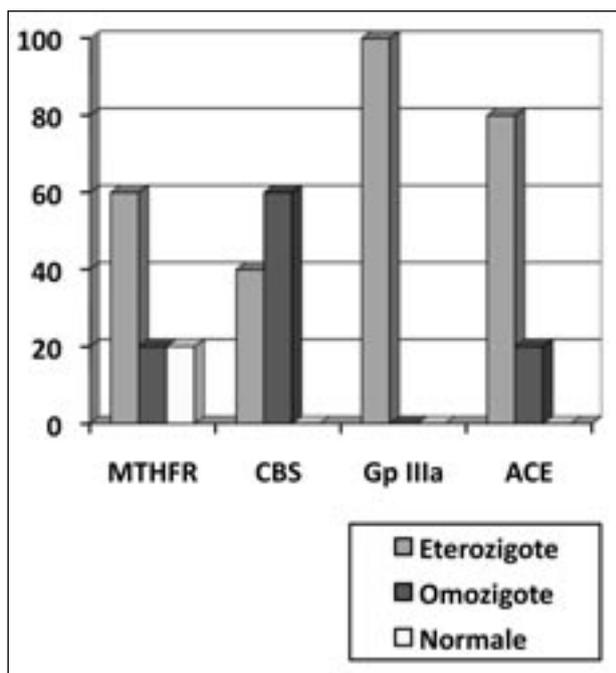


Figura 2 - Minaccia di parto pretermine.

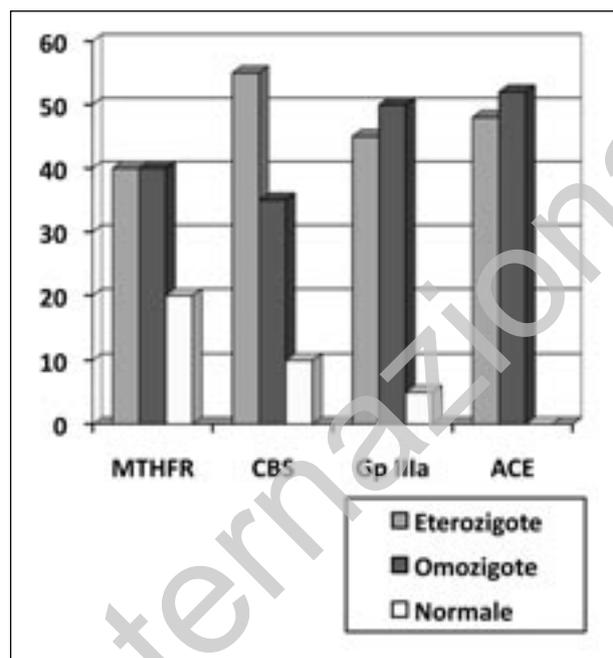


Figura 4 - Poliabortività.

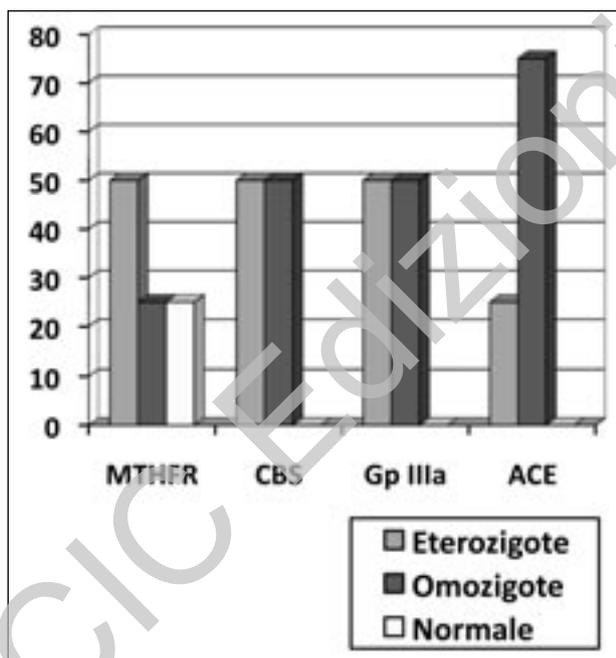


Figura 3 - Minaccia di aborto.

## Discussione e conclusioni

Il progetto genoma umano ha consegnato alla comunità scientifica internazionale una sequenza genetica di tre miliardi di paia di basi condivise al 99% da tutti gli individui.

Le differenze tra gli individui sono caratterizzate, per la maggior parte, da polimorfismi nucleotidici, ovvero cambiamenti di una singola base nel DNA.

Quello che si sta mettendo in evidenza è come alcuni polimorfismi genetici relativamente comuni, se associati tra loro o combinati con specifiche componenti ambientali possono elevare notevolmente lo sviluppo di patologie.

I fattori trombofilici più studiati vanno dalla proteina C e proteina S (cause frequenti di T.V.P.), mutazioni del fattore V di Leiden (resistenza alla proteina C attivata - A.P.C.R.), fattore II (aumentati livelli di pro-trombina e trombina), AT III (aumento dell'attività della pro-trombina), MTHFR (iperomocistinemia). A questi si sono aggiunti altri polimorfismi genetici (CBS, ACE, GpIIIa) che sono stati oggetto del nostro studio.

Nella nostra esperienza, infatti, la ricerca di tali polimorfismi in rapporto alle patologie ostetriche in esame ha mostrato una forte correlazione. Difatti nei casi di pre-eclampsia risulta molto frequente la presenza contemporanea di più mutazioni trombofiliche, piuttosto che la sola presenza del polimorfismo ACE DD.

In accordo con i nostri risultati possiamo affermare che *“la forza di associazione tra polimorfismo ACE DD e gestosi è maggiore soprattutto quando nella donna sono presenti, contemporaneamente, altre condizioni di predisposizione ad ipertensione ed aterosclerosi”* (mutazioni di MTHFR, CBS e Gp IIIa).

Nei casi di minaccia di parto pretermine tutti i polimorfismi in esame sono altamente rappresentati, sia in omozigosi che eterozigosi: *MTHFR 80%; CBS, GpIIIa*

e ACE 100%. Questo si trova in perfetto accordo con il fatto che condizioni di predisposizione all'iperomocistinemia, iperaggregazione ed ipertensione, favorendo lo stato di ipossia placentare e di costante aumento delle resistenze in tale distretto arterioso, possono essere considerati fattori di rischio per la minaccia di parto pretermine, nonché minaccia di aborto e poliabortività (*studio Valdez e studio Fatini*).

In definitiva, allo stato attuale, tramite uno screening routinario, si è in grado di identificare tutti i soggetti a rischio di trombofilia ereditaria.

Esistendo, però, un'ampia gamma di polimorfismo e di eterozigosi, a cui non sempre seguono complicanze ostetriche: "quale è, allora, il reale rapporto costo-beneficio di tale approccio?"

Non c'è dubbio sulla "non convenienza" di uno screening di massa, ma certamente trova giustificazione, indipendentemente dal costo, su pazienti selezionate e che presentano evidenti fattori di rischio per patologia trombo-embolica.

La perdita di un individuo giovane in età riproduttiva ha un peso incalcolabile sull'equilibrio sociale, oltre quello più strettamente affettivo nell'ambito familiare!

Riteniamo pertanto, alla luce della nostra esperienza, che sia utile, specialmente nelle pazienti ostetriche, affiancare alle indagini tradizionali anche la ricerca dei polimorfismi oggetti del nostro studio (CBS; GpIIIa; ACE).

I nostri dati non possono essere di certo conclusivi, vista l'esiguità numerica della popolazione studiata e la mancanza di un gruppo di controllo. Pertanto, crediamo che siano indispensabili ulteriori studi sia per confermare le correlazioni tra le patologie ostetriche e i polimorfismi genetici (CBS, ACE, GpIIIa), sia per individuare terapie specifiche (terapia genica).

In conclusione restano ancora da chiarire almeno due punti: - quali pazienti sottoporre, effettivamente, allo screening; - se e quale terapia somministrare alle pazienti portatrici di queste mutazioni.

## Bibliografia

- Alfirevic Z., Mousa H.A., Martlew V. et al.: "Postnatal screening for trombophilia in woman with severe pregnancy complications". *Obstet & Gyn vol.97*.
- Alfirevic Z., Roberts D., Martlew V. "How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review". *European Journal of Obstet & Gynn and Reprod. Biology* 101 (2002) 6-14.
- Bray P.F., David A. Lane and Peter J., Grant.: Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Blood*, 1 march 2000, vol. 95, number 5.
- Brenner B.: Inherited thrombophilia and fetal loss. *Courrent Opin. Haematol.* 2000; 7: 290-5.
- Brenner B., Hoffman R., Blumenfeld Z., Weiner Z., Younis J.S.: Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparinn. *Thromb. Haemost.* 2000; 83: 693-7.
- Couman A.B., Huijgens P.C., Jakobs C. et al.: Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. *Human Reproduction* 1999; 14: 211-214
- Eldor A.: Thrombophilia, thrombosis and pregnancy. *Thromb. Haemost.* 86; 104-11, 2001.
- Eskenazi B., Fenster L., Sidney S.: A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *Jamaa* 1991; 266:237-241
- Ethan J. Weiss, B.A., Bray P.F., M.D., Matthew Tayback, Sc.D., Steven P. Schulman, M.D., Thomas S. Kickler, M.D., Lewis C. Becker, M.D., James L. Weiss, M.D., Gary Gerstenblith, M.D., Pascal J., Goldschmidt-Clermont M.D.: A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis. *The New England Journal*. Vol. 334:1090-1094; 25 April, 1996; number 17.
- Facchinetti F, Marozio L, Grandone E, Pizzi C, Volpe A, Benedetto C. Thrombophilic mutations are a main risk factor for placental abrupto. *Haematologica* 2003 Jul;88(7):785-8.
- Fatini C, Gensini F, Battagliani B, Prisco D, Cellai Ap, Fedi S, Marcucci R, Brunelli T, Mello G, Parretti E, Pepe G, Abbate R. Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*: October 2000 - Volume 11 - Issue 7 - pp 657-662.
- Foka Z.J., Lambropoulos A. F., Saravelos H., Karas G.B., Karavida A., Agorastos T. et al.: Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 15:458-62.
- Franco R.F., Reitsma P.H.: Genetic Risk Factors of venous thrombosis. *Human Genetics* 2001; 109: 369-384.
- Girling J., De Swiet M.: Inherited thrombophilia and pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 10 (1998) 135.
- Girling J. Et al.: Inherited thrombophilia and pregnancy. *Courrent Opinions in Ostet.Gynecol.* 1998; 10: 135-144.
- Grandone E.: Linee Guida SISET in ostetricia e Ginecologia. *Hematologica* 2002 [www.siset.org](http://www.siset.org).
- Grandone E., Brancaccio V., Colaizzo D., Sciannone N., Pavone G., Di Minno G., Margaglione M.: Preventing adverse obstetric outcomes in women with genetic thrombophilia. *Fertil Steril.* 2002 Aug; 78(2):371-5.
- Grandone E., Margaglione M., Colaizzo D., Cappucci G., Paladini D., Martinelli P., Montanaro S., Pavone G., Di Minno G.: Factor V Leiden, C-T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to pre-eclampsia. *Thromb. Haemost.* 77; 1052-1054, 1997.
- Grandone E., Margaglione M., Colaizzod., D'andrea G., Cappucci G., Brancaccio V. et al.: Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of Factor V Leiden, prhrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*1998; 179 (5):1324-8.
- Greer I.A.: Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thrombosis Research* 2003; 109:73-81.
- Gris et al.: Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late foetal loss and non thrombotic antecedent *Throm Haemost* 1999; 81: 891-9.

22. Gürdöl F, I<sup>^</sup>Bilen E, Yilmaz H, Isbir T, Dirican A. The association between preeclampsia and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Chim Acta*. 2004 Mar; 341(1-2):127-31.
23. Kobashi G., Hata A., Shido K., Ohta K., Yamada H., Kato E.H., Minakami H., Tamashiro H., Fujimoto S., Kondo K.: Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in Japanese patients. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Jun; 31(3):346-50.
24. Krabbendam I, Dekker GA. Pregnancy outcome in patients with a history of recurrent spontaneous miscarriages and documented Thrombophilias. *Gynecol&obstet. Invest*. 2004;57(3):127-131. Epub 2003 Dec 23.
25. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004 191, 412-24.
26. Kupfermanc M.J., Fait G., Many A., et al. "Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations" *Obst & Gyn Vol. 96 n° 1, July 2000*.
27. Kupfermanc M.J., Eldor A., Steinman N. et al.: Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *New England Journal of Medicine* 1999; 340: 9-13.
28. Livingston JC, Barton JR, Park V, Haddad B, Phillips O, Sibai BM. Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe Am J Obstet Gynecol. 2001 Jul; 185(1):153-7.
29. Lockwood C.J.: Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet. Gynecol*. 2002; vol 99 (2): 333-341.
30. Martinelli I., Taioli E., Cetin I., Marinoni A., Gerosa S., Villa M.V., Bozzo M., Mannucci P.M.: Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N.Engl.J.Med*. 343; 1015-1018, 2000.
31. Martinelli I. et al.: Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thromb. Haemost*. 2001; 86: 800-3.
32. Martinelli I. et al.: Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *NEJM* 2000; 343: 1015-8.
33. Mousa H.A., Alfirevic Z.: Do placental lesions reflect thrombophilia state in women with adverse pregnancy outcome? *Human Reproduction* 2000; 15: 1830-1833.
34. Ougueh O., Chen M.F., Spurrill G., Benjamin A. Intern J. "Outcome of pregnancy in women with hereditary thrombophilia" of *Gyn&Obst*.74 (2001) 247-253.
35. Preston F.E., Rosendaal F.R., Walzer I.D., Briet E., Berntorp E., Canard J. et al.: Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348:913-6
36. Redman C.W.G.: Platelets and the beginning of preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 478-480.
37. Rey E., Kahan S.R., David M., Shrieri.: Thrombophilic disorders and fetal loss:a metanalysis.*Lancet* 2003; 361:901-8
38. Scifres Cm, Macones GA.: The utility of thrombophilia testing in pregnant women with thrombosis: fact or fiction? *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Oct; 199(4):344.e1-7. Epub 2008 Jun 24.
39. Stirrat G.M.: Recurrent miscarriages: Definition and Epidemiology. *Lancet* 1990; 336: 673-675
40. Tolino A., Battista L., D'Ettore A.: *Le gestosi*. Cofese Edizioni, Palermo, 2007.
41. Valdez L.L., Quintero A., Garcia E., Olivares N., Celis A., Rivas F Jr, Rivas F.: Thrombophilic polymorphisms in preterm delivery. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Jul-Aug; 33(1):51-6.
42. Velloso Ep., Vieira R., Cabral A.C., Kalapothakis E., Santos R.A.: Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin converting enzyme deletion/deletion genotype. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Apr; 40(4):583-90.
43. Villareal C., Garcia-Aguirre G., Herndezc., Vega O., Borbolla J.R., Collados M.T.: Congenital thrombophilia associated to obstetric complications. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2002; 14 (2): 163-169
44. Voetsch B, Loscalzo J. Genetics of thrombophilia: impact on atherogenesis *Curr Opin Lipidol*. 2004 Apr; 15(2):129-43.