

SCHEDA INFORMATIVA TROMBOFILIA

I fenomeni di abortività in gravidanza sono purtroppo eventi non rari. Insieme alle alterazioni ormonali, immunitarie, uterine, e cromosomiche, note come possibili cause di aborti ripetuti, esiste una nuova classe di anomalie genetiche che riguardano i fattori della coagulazione del sangue.

Le donne che soffrono di Trombofilia ereditaria (eccessiva coagulazione causata da un'anomalia genetica) sono infatti la categoria più a rischio di aborto uterino a gravidanza avanzata. Nella maggior parte dei casi la morte del feto è causata da alterazioni geniche di uno o più fattori della coagulazione del sangue che determinano l'instaurarsi di una trombosi placentare, caratterizzata da un'ostruzione dei vasi sanguigni placentari.

I geni, oggi noti, di suscettibilità alla trombosi sono delle varianti geniche (mutazioni di una singola base del DNA) che presentano una tale frequenza nella popolazione da essere considerate delle varianti polimorfiche. I geni presi in considerazione sono quelli relativi al Fattore V (Fattore V di Leiden, Fattore V HR2, Fattore V aplotipo Y), al Fattore II della coagulazione (protrombina), il gene MTHFR (Metilentetraidrofolato reductasi), il PAI-1 (Inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno), l'ITGB3 (gene che codifica la GPIIb/IIIa), Beta-fibrinogeno, ACE (enzima di conversione dell'angiotensina I), AGT (angiotensinogeno), Fattore VII, Fattore XIII (fattore stabilizzante la fibrina), ApoE, ApoB.

Lo studio delle varianti geniche di questi tre geni è indicato in:

- Soggetti con precedenti episodi di tromboembolismo venoso o trombosi arteriosa,
- Donne che intendono assumere contraccettivi orali,
- Donne con precedenti episodi di trombosi in gravidanza,
- Donne con poliabortività,
- Donne con precedente figlio con DTN (difetti tubo neurale),
- Gestanti con ritardo di crescita intrauterino (IUGR), tromboflebite o trombosi placentare,
- Soggetti diabetici.

Dal punto di vista della trasmissione genetica, la maggior parte dei difetti trombofilici si presenta in forma eterozigote e si trasmette 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. In gravidanza, una condizione genetica di eterozigosi o omozigosi per uno o più di questi geni è considerata predisponente all'aborto spontaneo.

- L'analisi viene eseguita su un campione di sangue venoso periferico in **due provette di EDTA** e prevede:
 - Compilazione accurata del CONSENSO INFORMATO.
 - Estrazione del DNA da sangue periferico. Amplificazione con oligonucleotidi specifici e successiva rilevazione mediante tecnica Real-Time per la determinazione delle mutazioni ricercate. La metodica permette di identificare i seguenti genotipi: *omozigote normale*, *eterozigote*, *omozigote mutato*

MTHFR (A1298C) (C677T)

Il **gene MTHFR** codifica per l'enzima **metilen-tetraidrofolato reductasi**, coinvolto nella conversione del 5,10-metilen-tetraidrofolato in 5-metil-tetraidrofolato, una molecola che consente la **rimetilazione dell'omocisteina** in **metionina**, tramite l'intervento della **vitamina B12** come cofattore. L'enzima riduce la concentrazione di omocisteina, trasformandola in metionina. Esistono mutazioni a carico del gene MTHFR trasmesse con **modalità recessiva**. Ciò significa che la malattia può esprimersi quando il genotipo è omozigote, cioè possiede entrambi gli alleli del gene mutati. Per genotipo eterozigote si definisce, invece, la condizione di portatore sano.

La mutazione determina la produzione di un **MTHFR** con un'**attività enzimatica ridotta con conseguente** aumento dei livelli sierici di omocisteina.

Le mutazioni più comuni a carico del gene MTHFR sono la C677T e la A1298C.

La mutazione MTHFR C677T (in cui avviene una sostituzione della Citosina al posto della Timina in posizione 677 della catena nucleotidica del gene) provoca un'alterazione della struttura proteica. Ne consegue una riduzione dell'attività funzionale enzimatica che comincia a manifestarsi in maniera considerevole nei soggetti omozigoti per l'allele 677/T (genotipo T/T). Tale condizione è associata a rischio cardiovascolare, malformazioni fetali, adenoma colonrettale, cancro della mammella e dell'ovaio. La mutazione MTHFR A1298C (in cui avviene una sostituzione dell'Adenina al posto della Citosina in posizione 1298 della catena nucleotidica del gene) modifica la struttura proteica in una regione di regolazione, provocando una riduzione dell'attività dell'MTHFR.

Generalmente, questa riduzione non è associata ad una alterazione dei livelli sierici di omocisteina nei soggetti portatori dell'allele normale per la mutazione C677T. La doppia eterozigosi, ossia la copresenza delle mutazioni

MTHFR C677T e A1298C, determina una riduzione dei livelli di acido folico ed è, in termini di effetto, equivalente allo stato di omozigosi 677 T/T.

FATTORE II (G20210A)

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. È stata descritta una variante genetica comune nella regione non trascritta al 3' del gene che è associata ad elevati livelli di protrombina funzionale nel plasma e conseguente aumentato rischio di trombosi, specie di tipo venosa. 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, quale la stabilità dell'RNA messaggero o con una maggiore efficienza di trascrizione del messaggero stesso. La frequenza genica della variante è bassa (1,0-1,5%) con una percentuale di eterozigoti (genotipo GA) del 2-3%. L'omozigosi (genotipo AA) è rara.

FATTORE V DI LEIDEN (G1691A)

Il Fattore V attivato è un cofattore essenziale per l'attivazione della *protrombina* (fattore II) a *trombina*. Il suo effetto pro-coagulante è normalmente inibito dalla *Proteina C attivata* che taglia il fattore V attivato in tre parti. Un sito di taglio è identificato nell'amminoacido arginina alla posizione 506.

Una mutazione del gene che codifica per il fattore V, a livello della tripletta nucleotidica che codifica per l'arginina in 506 (nucleotide 1691), con sostituzione di una G (guanina) con una A (adenina), comporta la sostituzione dell'arginina con un altro amminoacido, la glutammina che impedisce il taglio da parte della Proteina C attivata. Ne consegue una resistenza alla proteina C attivata (APC) nei test di laboratorio ed una maggiore attività pro-coagulante del fattore V attivato che predispone alla trombosi. Tale variante G1691A è definita variante di Leiden (località in cui fu scoperta), ed ha una frequenza allelica dell'1,4-4,2% in Europa con una frequenza di portatori in eterozigosi (genotipo GA) in Italia pari al 2-3%, mentre l'omozigosi (genotipo AA) per tale mutazione ha un'incidenza di 1:5000.

FATTORE V HR2 (H1299R)

È stata descritta una variante genetica del fattore V, H1299R, che consiste nella sostituzione di una adenina con una guanina in posizione 4070 del gene, e comporta a livello proteico la sostituzione di istidina con un residuo di arginina in posizione 1299. Diversi studi hanno dimostrato che questa alterazione H1299R aumenterà di 2-3 volte il rischio di Tromboembolismo Venoso (VTE). Inoltre, in coppie in cui si sono verificati aborti spontanei, è stato osservato che le mutazioni della protrombina G20210A e del fattore V H1299R hanno una prevalenza significativamente maggiore tra le donne rispetto agli uomini, con un plausibile coinvolgimento nella patogenesi della poliabortività.

FATTORE V (Y1702C)

La mutazione Y1702C (A5279G) consiste nella sostituzione di una adenina con una guanina in posizione 5279 del gene e comporta a livello proteico la sostituzione di una tirosina con un residuo di cisteina in posizione 1702 del Fattore V della coagulazione. Tale polimorfismo, se associato al Fattore V di Leiden, aumenta il rischio di trombosi. In particolare, la mutazione Y1702C rafforza la resistenza alla proteina C attivata nei portatori della mutazione R506Q (Leiden) o H1229R aplotipo HR2.

PAI-1 (5G/4G)

Il sistema fibrinolitico, meccanismo opposto a quello della coagulazione ed in equilibrio con esso in condizioni di normale flusso sanguigno, è basato sul plasminogeno, che è convertito in plasmina dall'attivatore del plasminogeno. L'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) è il maggiore inibitore del sistema fibrinolitico ed è prodotto da una varietà di cellule tra cui il fegato, le piastrine, le cellule endoteliali e quelle muscolari lisce delle pareti vasali.

Il gene PAI-1 presenta un polimorfismo (SNP) di delezione di una singola G (4G/5G) alla posizione -675 dal sito di inizio della trascrizione. Il 26% della popolazione presenta un genotipo 4G/4G (omozigote mutato), il 50% è eterozigote (4G/5G) ed il 24% possiede un genotipo 5G/5G.

L'allele 4G è stato associato ad un aumentato rischio trombotico, in quanto correlato ad un aumento dell'attività trascrizionale del gene e quindi ad aumentati livelli plasmatici di

PAI-1, che nella condizione di omozigosi 4G/4G sono del 25% più alti rispetto ai soggetti con genotipo 5G/5G.

ITGB3 (T1565C)

È stato dimostrato che polimorfismi del gene ITGB3 contengono molte regioni polimorfiche, una delle quali è risultata associata a molteplici patologie.

La caratterizzazione del gene che codifica la GPIIb/IIIa, ITGB3, permette di distinguere le due forme alleliche P(A1) o HPA1a e P(A2) o HPA1b determinate dal polimorfismo Leu33Pro.

Tale polimorfismo (T1565C, dbSNP ID: rs5918) corrisponde ad una sostituzione del residuo amminoacidico (leucina/prolina) nella posizione 33 (P(A1)/A2) della catena polipeptidica. È stato riportato che questo SNP è un fattore di rischio per molti tipi di patologie, come infarto miocardico, cardiopatia ischemica, diabete di tipo 2, asma, molti tumori tra cui il linfoma non-Hodgkin il carcinoma del colon, il carcinoma ovarico ed cancro renale. È stato inoltre

documentato che le piastrine recanti la subunità β_3 dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ con una prolina in posizione 33 sono caratterizzate da un aumentato rischio di aggregazione e proprietà immunogeniche delle piastrine. La variante PLA2 dà origine a una proteina GPIIIa con una maggiore affinità con il fibrinogeno predisponendo ad un incremento del rischio di formazione di trombi.

ApoE

Il polimorfismo del gene ApoE determina tre varianti alleliche: **E2** associato ad un ridotto livello di colesterolo totale ed LDL con effetto protettivo e ridotto rischio di Alzheimer, correlato a longevità; **E3** allele predominante nella popolazione normale, con livelli di colesterolo totale ed LDL normali; **E4** associato ad un elevato livello di colesterolo totale ed LDL con conseguente rischio di patologie coronariche e di Alzheimer. I geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca non sono completamente conosciuti a tutt'oggi, ed è quindi difficile "quantificare" il rischio relativo per i singoli polimorfismi. Tuttavia, le linee guida invitano a tener presente la **combinazione** di più polimorfismi che (insieme a fattori ambientali esterni) può migliorare le capacità predittive del calcolo di "rischio cardiovascolare".

Apo B(R3500Q)

Le apolipoproteine sono delle proteine appartenenti ai complessi VLDL e LDL (lipoproteine a densità molto bassa e lipoproteine a bassa densità) e sono responsabili della solubilità dei lipidi nel sangue e del loro riassorbimento nelle cellule. L'apolipoproteina difettosa familiare B-100 (FDB) è una malattia genetica in cui seppur l'apolipoproteina B-100 viene normalmente tradotta ed assemblata nelle LDL (lipoproteine a bassa densità), queste ultime risultano avere una affinità marcatamente ridotta per il recettore delle LDL stesso, che è presente sugli epatociti. Il risultato conseguente è ipercolesterolemia ed aterosclerosi prematura. FDB è causata dalla mutazione a livello aminoacidico (R3500Q) che determina i cambiamenti conformazionali proteici di cui sopra (nella proteina Apo B-100, l'arginina 3500 interagisce con il triptofano 4369 evento cruciale per determinare la corretta conformazione richiesta per il normale riconoscimento del recettore di membrana delle LDL). Questa mutazione causa inoltre una alterazione nella normale assunzione di colesterolo epatico e la calcificazione delle arterie coronariche. È stato dimostrato che il 3,5% dei casi di ipercolesterolemia ha come causa primaria una mutazione sul gene dell'Apo B-100 (Shen H, et al., Arch Intern Med. 2010; Soria LF, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1989).

ACE (Ins/Del)

L'enzima di conversione dell'angiotensina I trasforma l'angiotensina I in angiotensina II, uno dei principali componenti del sistema renina-angiotensina che controlla la pressione sanguigna e il volume ematico circolante. Il gene **ACE** codificante l'enzima presenta un polimorfismo che consiste nella presenza (inserzione Ins) o nell'assenza (delezione Del) di una sequenza di 287 coppie di basi. Il polimorfismo può produrre tre diversi genotipi: Ins/Ins inserzione in omozigosi (genotipo normale o di riferimento), Ins/Del inserzione/delezione in eterozigosi, Del/Del delezione in omozigosi.

Recenti studi hanno dimostrato che la variante Del, solo se presente in entrambe le copie del gene (genotipo Del/Del), predispone a fenomeni di ipertensione e ad alterazione dell'equilibrio idrico ed elettrolitico più marcati, rispetto a soggetti che hanno la variante I (omozigoti Ins/Ins ed eterozigoti Ins/Del). Inoltre il genotipo Del/Del è un fattore di rischio indipendente per l'infarto del miocardio, quindi è considerato il più pericoloso dei tre genotipi.

AGT (T704C)

L'angiotensinogeno è una proteina presente nel plasma, sintetizzata e secreta soprattutto dal fegato. È composto da 452 aminoacidi e viene convertito in angiotensina-I dalla renina, un'enzima proteolitico sintetizzato nell'apparato iuxtaglomerulare sotto forma di precursore (prorenina). A sua volta l'angiotensina-I viene sottoposta all'azione dell'ACE (Angiotensin Converting Enzyme) e convertita in angiotensina-II. Ormoni – corticosteroidi, ormoni tiroidei e la stessa angiotensina II – stimolano la sintesi di angiotensinogeno. In alcune persone il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è iperattivo, determinando perciò problemi al cuore e pressione arteriosa alta.

Nel gene AGT è stato identificato il polimorfismo T704C (Met235Thr), l'aminoacido metionina è sostituito dall'aminoacido treonina nella posizione 235 del polipeptide angiotensinogeno. Diversi studi dimostrano che soggetti portatori della variante C, soprattutto in omozigosi (genotipo CC) hanno un rischio maggiore di insorgenza di alcune patologie cardiovascolari (coronaropatie, infarto del miocardio) e particolari forme di ipertensione, rispetto agli individui con la variante T (genotipo TT).

β -FIBRINOGENO (G455A)

Il fibrinogeno (o Fattore I) è una glicoproteina presente nel sangue, fondamentale nel processo di aggregazione piastrinica e, in quanto precursore della fibrina, nella formazione del coagulo, evento finale della cascata coagulativa. Il gene codificante il **beta-fibrinogeno** presenta un polimorfismo (-455G>A) che porta ad un innalzamento dei livelli plasmatici di fibrinogeno e ad un maggior rischio di sviluppare patologie cardiovascolari in soggetti geneticamente predisposti (genotipo GA o AA).

FATTORE XIII (G103T)

Il **Fattore XIII** denominato anche fattore stabilizzante la fibrina, protransglutaminasi plasmatica o fattore di Laki-Lorand, riveste un ruolo decisivo nelle fasi conclusive del processo coagulativo. Tale proteina viene attivata mediante taglio proteolitico ad opera del Fattore II (la trombina), in presenza di ioni calcio e fibrina: viene così agevolato il legame tra molecole di fibrina neoformate dando luogo alla formazione di un reticolo di fibrina (reticolazione monomeri fibrina), stabilizzando così il coagulo. Uno stato di omozigosi per un particolare polimorfismo, transizione G→T con conseguente variazione aminoacidica leucina→valina (V34L) a livello della posizione aminoacidica 34, residuo prossimo al sito di attivazione della trombina. Questa mutazione è stata associata a un aumento elevato dell'attività del Fattore XIII (efficienza catalitica 2,5 più alta), rappresentando quindi se presente in omozigosi un fattore protettivo contro trombosi venose. Recenti studi hanno riportato che il Fattore XIII mutato V34L determina una diminuzione del rischio per la coronaropatia, l'infrazione del miocardio e la malattia cerebrovascolare. La forma mutata V34L (genotipo T/T) è relativamente comune nella popolazione caucasica (20-35%), ma rara (1%) in asiatici orientali.

FATTORE VII (R353Q)

Dal punto di vista genetico è forse il deficit meglio caratterizzato, sia per le piccole dimensioni del gene sia perché è la condizione più frequente. Diversi tipi di mutazione (soprattutto missense e mutazioni dei siti di splicing) sono state caratterizzate in quasi tutte le porzioni del gene (localizzato sul cromosoma 13). Il deficit di FVII mostra scarsa correlazione tra tipo di mutazione, livelli circolanti di proteina e presentazione clinica. Una delle spiegazioni potrebbe essere la presenza di polimorfismi o/e varianti genetiche molto frequenti nella popolazione e non considerate mutazioni causative) che contribuiscono a ridurre i livelli di FVII circolante ma il cui ruolo sulla clinica non è ancora chiaro.

➤ **Refertazione**

La refertazione è prevista entro:

- 10 giorni lavorativi MTHFR (A1298C) (C677T);
- 10 giorni lavorativi Fattore V Leiden (G1691A);
- 10 giorni lavorativi Fattore V HR2 (H1299R);
- 10 giorni lavorativi Fattore V Aplotipo Y (Y1702C);
- 10 giorni lavorativi Fattore II (G20210A);
- 10 giorni lavorativi ITGB3 (T1565C);
- 10 giorni lavorativi PAI-1 (5G/4G);
- 10 giorni lavorativi Fattore VII (R353Q);
- 10 giorni lavorativi Fattore XIII (G103T);
- 30 giorni lavorativi ApoE;
- 15 giorni lavorativi ApoB (R3500Q);
- 15 giorni lavorativi ACE (Ins/Del);
- 10 giorni lavorativi AGT (T704C);
- 15 giorni lavorativi β-FIBRINOGENO (G455A).

È possibile scaricare il referto collegandosi al sito www.lirspa.com e accedendo all'*area Referti* con le credenziali ricevute via sms/e-mail.

➤ **Limiti dell'indagine**

- Nel caso il risultato dell'analisi genetica identifichi la presenza di una o più mutazioni viene consigliata consulenza genetica.
- Il test sarà strettamente limitato a rilevare le specifiche varianti indicate in questo consenso.
- Il test potrebbe fornire un risultato non conclusivo per la natura intrinseca del campione (a livello quantitativo o qualitativo). In questo caso, potrebbe richiedersi la raccolta di un nuovo campione.

➤ **Esecuzione di ulteriori indagini di approfondimento**

- In alcuni casi, per una corretta/completa valutazione è necessario ricorrere ad ulteriori indagini di approfondimento;



- Il risultato dell'analisi genetica può condurre a consigliare analisi genetica a consanguinei e partner;
- Quando siano coinvolti più familiari, se i legami di parentela di coloro che si sottopongono al test sono diversi da quanto dichiarato, il test può identificare tale situazione (ad esempio quando il padre anagrafico non sia quello biologico);

➤ ***Conservazione del materiale biologico***

Dopo l'esecuzione del test molecolare, il DNA e il materiale biologico verranno conservati, presso il Laboratorio almeno fino a 15 giorni dalla emissione del referto se il quesito diagnostico è stato risolto, per almeno 10 anni se si tratta di un caso non risolto. Possono fare eccezione campioni di interesse scientifico che, in caso di autorizzazione o anonimizzazione, possono venir conservati fino ad un massimo di 10 anni.

I risultati dell'analisi vanno valutati dal medico inviante in sede di consulenza genetica, contestualmente ai dati clinico-anamnestici del paziente.