

# TROMBOFILIA: ASPETTI MOLECOLARI

## Relazione Tecnica

A Cura di:

Dott.ssa Alfonsi C., Dott. Di Pietro F., Dott. Gabrielli F.

Biolab Srl

Test Trombofilia **Veintalia** DNA®

In collaborazione con:



## Sommario

<b>TROMBOFILIA: ASPETTI MOLECOLARI</b> .....	2
FATTORE V DI LEIDEN .....	3
PROTROMBINA – FATTORE II .....	4
MTHFR – GENE DELLA METILENETETRAIDROFOLATOREDDUTTASI .....	5
<b>ANALISI DELLE MUTAZIONI: TECNOLOGIA UTILIZZATA</b> .....	6
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	8

## TROMBOFILIA: ASPETTI MOLECOLARI

Per trombofilia ereditaria si intendono quelle condizioni predisponenti ad un aumentato rischio di malattia tromboembolica venosa (TEV) e, in alcune condizioni, anche di trombosi arteriosa. Sebbene l'introduzione sistematica di misure di prevenzione del tromboembolismo venoso abbia ridotto negli ultimi anni l'incidenza degli eventi post-operatori, tuttavia rimangono comunque alti l'incidenza totale, la prevalenza e la mortalità per tromboembolismo venoso. Attualmente si stima che l'incidenza nella popolazione occidentale sia di 1 caso su 1000 abitanti all'anno mentre la mortalità nei pazienti con EP si attesta intorno al 15%. Tali eventi si verificano principalmente a causa della natura silente di tale complicanza e alla scarsa specificità nella presentazione clinica. Diventa pertanto di fondamentale importanza la possibilità di individuare i soggetti a rischio definendo le migliori indicazioni per uno screening di popolazione che tengano conto contemporaneamente dell'efficacia dello screening ma anche dei suoi costi e della sua sostenibilità.

Dagli anni '90 sono stati osservati dei difetti genetici definiti polimorfismi predisponenti alla trombosi. Quando è presente una mutazione severa, il fenotipo emergente è fortemente diverso dal wild type e facilmente identificabile. Nella pratica clinica si possono osservare varianti genetiche che esprimono un fenotipo solo leggermente diverso dal normale, tanto da non essere clinicamente riconoscibile. La presenza contemporanea di altre varianti nell'ambito della medesima via metabolica e/o di fattori ambientali può determinare il superamento di una soglia, con la comparsa del fenotipo "malattia". La trombofilia è da considerare come un complesso multifattoriale nel quale interagiscono diverse componenti genetiche e ambientali.

Alcune di queste componenti genetiche polimorfiche sono state identificate e ancora oggi ne vengono descritte diverse e possono essere raggruppate in 3 principali categorie di rischio: alto, moderato e basso.

Un rischio alto è associato ad alcune mutazioni che portano ad un deficit di anticoagulanti naturali (Es. deficit di antitrombina III, proteina C e proteina S) ma sono condizioni estremamente rare nella popolazione generale con una prevalenza dello 0,02-0,5%.

Altre mutazioni, invece, considerate come fattori di rischio moderati, si riscontrano nella popolazione generale con una prevalenza maggiore.

Tra i fattori di rischio moderato troviamo:

## FATTORE V DI LEIDEN

L'osservazione che alcuni plasmi resistevano all'azione della proteina C attivata (activated protein C resistance, APCr), ha portato alla scoperta del FV Leiden, un fattore V anomalo caratterizzato da resistenza all'inattivazione indotta dalla proteina C attivata. La mutazione causa la sostituzione di un'adenina con una guanina nel nucleotide 1691 del gene del fattore V, che induce la sostituzione di un'arginina con una glicina in posizione 506 della molecola del fattore V (cioè in uno dei tre siti del fattore V che vengono clivati dalla proteina C attivata). Tale fattore V anomalo (definito fattore V Leiden, dalla città dove è stato scoperto) è pertanto in gran parte insensibile all'azione inibitrice della proteina C e costituisce un fattore ad attività protrombotica. **Il fattore V di Leiden ha una prevalenza del 5% nella popolazione generale mentre si riscontra nel 20% dei pazienti con un evento di trombosi venosa e nel 50% dei pazienti con trombofilia familiare.** In Italia la frequenza di portatori della mutazione in eterozigosi è pari al 2-3%, mentre in omozigosi la mutazione ha un'incidenza di 1:5000. I soggetti eterozigoti hanno un rischio 8 volte superiore di sviluppare una trombosi venosa, mentre gli omozigoti hanno un rischio pari ad 80 volte. Tale evento trombotico è favorito in presenza di altre condizioni predisponenti quali la gravidanza, l'assunzione di contraccettivi orali (rischio aumentato di 30 volte negli eterozigoti e di alcune centinaia negli omozigoti), gli interventi chirurgici. In gravidanza una condizione genetica di eterozigosi per il Fattore Leiden è considerata predisponente all'aborto spontaneo, alla eclampsia, ai difetti placentari, alla Sindrome HELLP (emolisi, elevazione enzimi epatici, piastrinopenia). La mutazione del FV di Leiden è associata a trombosi venosa profonda usualmente alle gambe, altri siti sono più insoliti. Le manifestazioni cliniche possono essere influenzate dal numero degli alleli interessati (le mutazioni in omozigosi portano ad un rischio molto maggiore), da altre varianti polimorfiche predisponenti, fattori di trombofilia acquisita come la presenza di anticorpi antifosfolipidi, alti

livelli di fattore VIII, neoplasie nonché dalla presenza di fattori circostanziali di rischio: viaggi, cateteri venosi centrali, gravidanza, uso di contraccettivi orali, terapia sostitutiva (HRT) e chirurgia maggiore.

**Oltre che come test di conferma nei casi di test coagulativi alterati, c'è un consenso generale nel raccomandare il test molecolare nei casi di:**

Pagina | 4

- una TEV senza altre cause ad ogni età ma soprattutto se <50 anni;
- una storia di tromboembolia venosa ricorrente;
- trombosi venosa in siti inusuali (ad esempio, le vene cerebrali, mesenteriche, portale ed epatica);
- una TEV durante la gravidanza o il puerperio;
- una TEV venosa associata all'uso di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva
- una TEV in un individuo con un familiare di primo grado con TEV prima dell'età di 50 anni

## PROTROMBINA – FATTORE II

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 nel plasma con conseguente sbilanciamento in senso pro-trombotico. Il polimorfismo in questo caso è una sostituzione di un nucleotide G con una A nella regione 3' non tradotta (20210G>A o c.\*97G>A). In questo caso anche se non c'è cambiamento amminoacidico la mutazione interessa una regione che è sicuramente coinvolta nella regolazione post-trascrizionale e agisce aumentando la stabilità dell'RNA messaggero o con una maggiore efficienza di trascrizione. La trasmissione è autosomica dominante a penetranza incompleta. L'espressione clinica della trombofilia legata alla mutazione della protrombina è variabile; molti individui eterozigoti o omozigoti per la 20210 G>A non sviluppano mai trombosi mentre alcuni eterozigoti rimangono asintomatici fino all'età adulta e alcuni hanno

tromboembolia ricorrente prima dei 30 anni. Il rischio relativo di TVP negli adulti eterozigoti per l'allele 20210 G>A è da 2 a 5 volte aumentato; nei bambini, il rischio relativo di trombosi è di 3-4 volte maggiore.

Nella popolazione generale la frequenza della mutazione 20210G>A è di circa il 2-5% mentre si riscontra nel 5-15% dei pazienti con trombosi venosa profonda.

C'è un generale consenso nel raccomandare l'esecuzione del test nei seguenti casi:

- prima TEV esitata prima dei 50 anni
- una storia di tromboembolia venosa ricorrente
- trombosi venosa in siti inusuali come vene cerebrali, mesenterica, portale o delle vene epatiche
- TEV durante la gravidanza o il puerperio;
- TEV associata con l'uso di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva
- un primo episodio di TEV a tutte le età in un individuo con un membro di primo grado della famiglia che ha avuto un TEV prima di 50 anni.

Tra i fattori di rischio più bassi:

### MTHFR – GENE DELLA METILENETETRAIDROFOLATOREDDUTASI

Questo enzima è uno dei 4 enzimi che intervengono nella trasformazione dell' omocisteina in metionina, reazione che si verifica durante la sintesi del DNA e a cui partecipano la vitamina B12, la vitamina B6 e l'acido folico. Tale reazione impedisce l'aumento della concentrazione plasmatica dell' omocisteina, che se presente ad elevate concentrazioni, determina un grave danno endoteliale, condizione predisponente lo sviluppo di trombosi arteriose. L'omocisteina è un aminoacido solforato, intermedio metabolico del metabolismo della metionina e della cisteina. La conversione dell' omocisteina a metionina (processo di rimetilazione) o la sua conversione a cisteina (transulfurazione) rappresentano le principali vie metaboliche in grado di mantenerne l'omeostasi. Il rilascio controllato nel circolo ematico, d'altra parte, consente di misurarne le concentrazioni

plasmatiche, che rappresentano un accurato indice dello stato dell'omocisteina tissutale. Un marcato incremento di questo aminoacido è presente in una malattia genetica autosomica recessiva causata dal deficit dell'enzima Cistationina-beta-sintetasi; le concentrazioni plasmatiche in questo caso sono molto elevate ( $> 100 \mu\text{M}$ ) tanto da superare la soglia di escrezione renale e causare la presenza di questo aminoacido nelle urine.

Alcuni polimorfismi genetici sono stati descritti in associazione all'iperomocistinemia nel gene MTHFR: c.677C> T, se presente in omozigosi, e in eterozigosi composta con 1298 A>G . Il primo polimorfismo è stato associato alla così detta "variante termolabile" del gene cioè una proteina con attività enzimatica diminuita se esposta al calore. Questo enzima fa parte del ciclo dei folati, cofattori dell' enzima MS (metionina sintetasi) che catalizza la conversione da Omocisteina a Metionina.

Anche se non c'è ancora concordanza tra gli autori su se e quando eseguire il test genetico, bisogna tener presente che:

- è utile sapere se un'iperomocisteinemia può essere dovuta alle modulazioni non genetiche ed essere, quindi, in alcuni casi transitoria, oppure a una predisposizione genetica.
- può essere utile per il clinico, in alcuni casi selezionati, sapere se quel paziente, con una omocistinemia normale, ha un rischio di sviluppare una iperomocistinemia nell'arco della vita (correlazione con l'età) a causa della predisposizione genetica.

## ANALISI DELLE MUTAZIONI: TECNOLOGIA UTILIZZATA

Per la ricerca delle mutazioni descritte si esegue inizialmente una reazione enzimatica di amplificazione del DNA, conosciuta come Polymerase Chain Reaction (PCR), che consente di amplificare *in vitro* una specifica regione della molecola, copiandola in varie fasi successive, fino ad ottenerne milioni di copie.

Successivamente i prodotti di PCR così ottenuti vengono sottoposti ad analisi di sequenza automatizzata mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente. L'analisi di mutazione viene

effettuata mediante analisi comparativa tra le sequenze ottenute per il campione in esame e le sequenze di riferimento dei geni investigati, depositate nel database internazionale GeneBank.

Attualmente la tecnica di sequenziamento Sanger rappresenta il GOLD STANDARD in campo diagnostico per la ricerca di mutazioni perché è l'unica tecnica che consente di rilevare mutazioni con un'accuratezza maggiore dell'99,99%. Sebbene sia possibile rilevare mutazioni anche con altre tecniche (Utilizzo di sonde fluorescenti, analisi delle curve di melting, Next generation sequencing, ...) tuttavia il metodo Sanger rimane l'unico metodo con le più elevate sensibilità e specificità tanto da dover essere utilizzato a supporto e riconferma delle mutazioni rilevate con gli altri metodi.

L'accuratezza del sequenziamento Sanger, inoltre, può essere monitorata attraverso la valutazione del Quality Value che è un'espressione della probabilità di errore di una sequenza e che può essere impostato in maniera tale da ridurre la probabilità di errore a meno dello 0,01%.

L'analisi genetica dei fattori predisponenti alla trombofilia (FV – FII – MTHFR I e II), rispetto ai test coagulativi funzionali, ha il vantaggio di non risentire delle alterazioni che si verificano in modo aspecifico durante la fase acuta di un evento trombotico, durante la terapia anticoagulante, durante la fase acuta di altre patologie, durante la terapia estroprogestinica, in gravidanza e in presenza di epatopatie.

Lo screening genetico permette quindi di ottenere un risultato e un'indicazione diagnostica che non risentono di interferenze dovute a terapie o fasi acute di patologie o dell'evento trombotico stesso, azzerando quindi la necessità della ripetizione degli esami con un conseguente risparmio sui costi.



## BIBLIOGRAFIA

F. R. ROSENDAAL and P. H. REITSMA: Genetics of venous thrombosis ; Article first published online: 13 JUL 2009; DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03394.x Journal of thrombosis and haemostasis

Pagina | 8

Bertina RM, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994;369:64-67

De Stefano V, Finaggi G, Mannucci PM: Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. Blood 1996;87:3531-44

Björn Dahlbäck : Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders; Blood 2008; 112(1):19-27

Italo Antonozzi e Elio Gulletta: Medicina di Laboratorio – Logica & Patologia Clinica; 2015, by Piccin Nuova Libreria SpA

Josè Manuel Soria, BSc, PhD et al.: Multilocus Genetic Risk Scores for Venous Thromboembolism Risk Assessment; Journal of the American Heart Association DOI: 10.1161/JAHA.114.001060

Svetlana Madjunkova,<sup>1</sup> Marija Volk,<sup>2</sup> Borut Peterlin,<sup>2</sup> and Dijana Plaseska-Karanfilska: Detection of Thrombophilic Mutations Related to Spontaneous Abortions by a Multiplex SNaPshot Method; GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS Volume 16, Number 4, 2012

Mark A. Crowther, MD; and John G. Kelton, MD: Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: A Qualitative Overview and Proposed Classification System; Ann Intern Med. 2003;138(2):128-134.

Frits R. Rosendaal et al.: Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior; ASH Education Book January 1, 2005 vol. 2005 no. 1 1-12

S.Testa et al.: Gli screening per trombofilia ; JLM Vol 5 N 2,2004

Gomes MP, Deitcher SR: Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review, in Arch. Intern. Med., vol. 164, n° 18, ottobre 2004, pp. 1965–76,

Simpson EL, Stevenson MD, Rawdin A, Papaioannou D,:

Thrombophilia testing in people with venous thromboembolism: systematic review and cost-effectiveness analysis, in Health Technol. Assess., vol. 13, n° 2, gennaio 2009, pp. iii, ix–x, 1–91, DOI:10.3310/hta13020, PMID 19080721.