

JANE DOE
VIA XXXXXXXX
80100 – NAPOLI (NA)
Data di nascita: XX/XX/XXXX
(XXXXX) (XXXX)
Data Accettazione: 28/06/2017

NAPOLI, 06/07/2017

Pagina 1 di 2

Sezione di Genetica Molecolare

**ANALISI MOLECOLARE DEI POLIMORFISMI ASSOCIATI
A RISCHIO TROMBOFILICO E CARDIOVASCOLARE**

CAMPIONE ANALIZZATO: SANGUE PERIFERICO.

L'analisi molecolare è stata eseguita su DNA estratto da cellule linfocitarie, mediante amplificazione con PCR ed ibridazione con sonde non radiomarcate.

NOTA BENE

Le mutazioni studiate sono trasmissibili per via genetica. Pertanto, in caso di positività, si consiglia la ricostruzione dell'albero genealogico e lo studio dei consanguinei diretti.

Alcune di queste mutazioni comportano scelte terapeutiche come l'assunzione di un farmaco.

Si rimanda al medico competente per i trattamenti in merito.

FATTORI DELLA COAGULAZIONE

Gene	Mutazione	Genotipo	Commento
F2 <i>Fattore II</i> <i>Protrombina</i>	G20210A <i>c.*97G>A</i> <i>rs1799963</i>	G/G	Omozigote normale
F5 <i>Fattore V</i> <i>Proaccelerina</i>	G1691A - R506Q <i>c.1601G>A - p.R534Q</i> <i>rs6025</i>	G/G	Omozigote normale
	A4070G – H1299R <i>c.3980A>G - p.H1327R</i> <i>rs1800595</i>	A/A	Omozigote normale
F13A1 <i>Fattore XIII</i> <i>Fattore Laki-Lorand</i>	V34L <i>c.103G>T - p.V34L</i> <i>rs5985</i>	G/G	Omozigote normale
FGB <i>β-Fibrinogeno</i>	-455G>A <i>c.-463G>A</i> <i>rs1800790</i>	G/G	Omozigote normale

FATTORI PIASTRINICI

Gene	Mutazione	Genotipo	Commento
ITGB3 <i>HPA-1 o P1^A</i>	T1565C <i>c.176T>C - p.L33P</i> <i>rs5918</i>	T/C	Eterozigote
Serpina1 <i>PAI-1</i>	5G/4G <i>g.4328_4329insG</i> <i>rs1799768</i>	4G/5G	Eterozigote

JANE DOE
 VIA XXXXXXXX
 80100 – NAPOLI (NA)
 Data di nascita: XX/XX/XXXX
 (XXXXX) (XXXX)
 Data Accettazione: 28/06/2017

NAPOLI, 06/07/2017

Pagina 2 di 2

CICLO DEI FOLATI

Gene	Mutazione	Genotipo	Commento
CBS <i>Cistationina beta sintasi</i>	844ins68 <i>c.833T>C + 844_845ins68</i> <i>rs5742905</i>	T/T	Omozigote normale
MTHFR <i>Metilentetraidrofolatoreddutasi</i>	C677T <i>c.665C>T - p.A222V</i> <i>rs1801133</i>	C/C	Omozigote normale
	A1298C <i>c.1286A>C - p..E429A</i> <i>rs1801131</i>	A/C	Eterozigote

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Gene	Mutazione	Genotipo	Commento
ACE <i>Enzima Angiotensina</i> <i>Convertente</i>	Ins/Del <i>c.2306-109_2306-108ins289</i> <i>rs4646994</i>	I/D	Eterozigote
AGT <i>Angiotensinogeno</i>	M235T <i>c.803T>C - p.M235T</i> <i>rs699</i>	T/T	Omozigote normale

APOLIPOPROTEINE

Gene	Mutazione	Genotipo	Commento
APOB	R3500Q <i>c.10580G>A - p.R3527Q</i> <i>rs5742904</i>	G/G	Omozigote normale
APOE	Cys112Arg <i>c.388T>C - p.C130R</i> <i>rs429358</i>	E3/E4	Leggi Note
	Arg176Cys <i>c.526C>T - p.R176C</i> <i>rs7412</i>		
	E2=Cys-Cys E3=Cys-Arg E4=Arg-Arg		

SPECIFICHE TECNICHE E VALIDAZIONE DEI METODI UTILIZZATI PER L'ESECUZIONE DELL'INDAGINE

Tutte le standardizzazioni (*sensibilità, robustezza, riproducibilità ed affidabilità*) sono state eseguite secondo le linee guida europee emanate da "European Network of Official Medicines Control Laboratories".

VALIDAZIONE DEGLI OPERATORI: Gli operatori che eseguono il test si sono sottoposti a validazione secondo la linea guida europea PA/PH/PCML (98 – 22).

NOTE INTEGRATIVE AL REFERTO

FATTORE II – G20210A

La frequenza genica della variante è bassa (1.0-1.5%) con una percentuale di eterozigoti del 2-3%. L'omozigosi mutante è rara. Per gli eterozigoti c'è un rischio aumentato di 3 volte di sviluppare una trombosi venosa, di 5 volte per l'ictus ischemico, di 5 volte per infarto miocardico in donne giovani; di 1.5 volte per gli uomini, di 7 volte nei diabetici, di 10 volte per trombosi delle vene cerebrali e di 149 volte in donne che assumono contraccettivi orali.

FATTORE V – G1691A E H1299R

La variante G1691A è definita variante di Leiden (località in cui fu scoperta), ed ha una frequenza genica dell' 1.4-4.2% in Europa con una frequenza di portatori in eterozigosi in Italia pari al 2-3%, mentre l'omozigosi per tale 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). Tali manifestazioni sarebbero legate a trombosi delle arterie spirali uterine con conseguente inadeguata perfusione placentare. I soggetti portatori di mutazione del Fattore V di Leiden dovrebbero pertanto sottoporsi a profilassi anticoagulativa in corso di gravidanza o in funzione di interventi chirurgici ed evitare l'assunzione di contraccettivi orali. La presenza contemporanea della variante Leiden e della variante H1299R (in eterozigosi o in omozigosi) conferisce un fattore di rischio di tromboembolismo di 3-4 volte superiore rispetto alla presenza della sola variante Leiden. Non si nota aumento del rischio quando l'aplotipo H1299R è associato ad altre mutazioni. **In caso di assenza della mutazione e di evidenza clinica di Resistenza alla Proteina C attivata (APC resistance), si consiglia la ricerca del Fattore V – Variante Cambridge.**

FATTORE XIII – V34L

Lo stato di omozigote mutato è stata associato a un aumento elevato dell'attività di questo enzima. La presenza di tale mutazione in omozigosi, quindi, rappresenterebbe un fattore **PROTETTIVO** contro trombosi venose.

BETA FIBRINOGENO -455G>A

Questo polimorfismo influenza la concentrazione plasmatica del fibrinogeno (con aumenti del 5%), specialmente nei fumatori. Lo stato di omozigote mutato è direttamente associato ad un aumento nei livelli di fibrinogeno con conseguente aumento del rischio di aterosclerosi, malattie arteriose periferiche ed infarto miocardico.

ITGB3 – T1565C

Differenti studi hanno associato la presenza di almeno un allele mutato a stati di ipercoagulazione, con conseguenti complicanze trombotiche venose.

SERPINA1 – 4G/5G

Alcuni studi hanno dimostrato che il genotipo 4G/4G è associato a livelli plasmatici elevato di PAI-1, con conseguente rischio di malattie coronariche e, nelle donne in gravidanza, aumentato rischio di preeclampsia.

MTHFR – C677T E A1298C

Questo polimorfismo provoca una riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR pari al 50%, fino al 30% in condizioni di esposizione al calore (variante termolabile). Tale variante comporta livelli elevati nel sangue di omocisteina specie dopo carico orale di metionina. La frequenza genica in Europa della mutazione è del 3-3.7% che comporta una condizione di eterozigosi in circa il 42-46% della popolazione e di omozigosi pari al 12-13%. Recentemente, una seconda mutazione del gene MTHFR (A1298C) è stata associata ad una ridotta attività enzimatica (circa il 60% singolarmente; circa il 40% se presente in associazione alla mutazione C677T). Questa mutazione, in pazienti portatori della mutazione C677T, determina un aumento dei livelli ematici di omocisteina.

Livelli aumentati di omocisteina nel sangue sono oggi considerati fattore di rischio per malattia vascolare, (trombosi arteriosa) forse attraverso un meccanismo mediato dai gruppi sulfidrilici sulla parete endoteliale dei vasi. Inoltre in condizioni di carenza alimentare di acido folico la variante termolabile della MTHFR porta a livelli molto bassi l'acido folico nel plasma ed è pertanto un fattore di rischio per i difetti del tubo neurale nelle donne in gravidanza. Condizioni di eterozigosi doppia, specie con la variante Leiden del fattore V comporta o della variante 20210 della protrombina, può aumentare il rischio relativo per il tromboembolismo venoso, già alto per la presenza dell'altra variante.

NOTE INTEGRATIVE AL REFERTO

CBS – 844INS68

L'eterozigosi per la 844INS68 è presente nel 10-15% della popolazione, questa si associa a iperomocisteinemia quando coesistono altre alterazioni genetiche.

ACE – INS/DEL

Differenti studi hanno associato il genotipo D/D con un incremento del rischio di patologie cardiovascolari, a causa di un conseguente aumento dei livelli plasmatici di ACE (doppi rispetto ai soggetti con genotipo I/I).

AGT – M235T

L'allele C del gene è associato con un incremento del rischio di patologie a carico delle arterie cardiache e con alcune forme di ipertensione.

Diversi studi hanno, infatti, dimostrato che i pazienti omozigoti mutati hanno un rischio 3 volte maggiore di sviluppare patologie cardiovascolari, quali coronaropatie, infarti miocardici, arteriosclerosi e cardiomiopatie ipertrofiche, rispetto ai pazienti omozigoti normali. Inoltre, i soggetti omozigoti mutati presentano una forma di ipertensione sodio-sensibile. L'analisi del gene AGT può inoltre aiutare i medici ad individuare una adeguata terapia da adottare prevedendo la risposta dei pazienti ai trattamenti terapeutici con agenti antiipertensivi. Nei pazienti che presentano un genotipo eterozigote o omozigote mutato, a differenza di quelli con genotipo omozigote normale, si osserva, infatti, un'evidente riduzione della pressione del sangue, sia sistolica che diastolica, in risposta all'uso di ACE-inibitori.

APOB

La mutazione R3500Q diminuisce l'affinità di questa lipoproteina per il recettore epatico delle LDL, causando un'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'ApoB.

APOE

ApoE esiste in tre principali isoforme (E2/E3/E4) e i polimorfismi che possono prodursi determinano sei genotipi diversi così definiti: ApoE 2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 e 4/4. Ad esempio, in relazione al recettore che questa apolipoproteina riconosce (recettore LDL) e paragonato con ApoE3, ApoE4 possiede un'affinità maggiore, mentre ApoE2 molto minore. Come conseguenza le lipoproteine vengono eliminate dal plasma molto più velocemente nei portatori dell'allele ApoE4. Il tutto causa una "down-regulation" dell'espressione dei recettori LDL epatici, con un conseguente aumento del tasso di colesterolo plasmatici. Nei pazienti con steatosi epatica non alcolica, l'allele dell'apolipoproteina E4 è associato con sostanziali cambiamenti nel contenuto plasmatico dei lipidi: il rapporto tra acidi grassi saturi e monoinsaturi aumenta, mentre diminuisce quello tra poli-insaturi e grassi saturi. L'analisi genetica dello stato di ApoE è utile per la prevenzione di rischio di iperlipoproteinemia (tipo III), così come l'isoforma ApoE4 è stata anche coinvolta nel rischio aumentato di contrarre la malattia di Alzheimer. Il metabolismo delle vitamine E e D è altresì differenzialmente influenzato dal genotipo di ApoE. Il genotipo 3/3 è il più frequente (60% della popolazione generale). Le componenti lipidiche degli spermatozoi hanno un ruolo importante nella attività funzionale di queste cellule. Ad esempio, la presenza del genotipo E3E4 conferisce un fattore di rischio per l'infertilità maschile pari a 3.82 (discretamente alto). Nelle donne l'allele E2 sembra essere associato con il più basso rendimento riproduttivo mentre E3 con il più alto. I diversi livelli di colesterolo totali associati con genotipo APOE potrebbero avere un effetto sulla produzione degli steroidi e di conseguenza determinare la differenziale fertilità osservata.

L'omozigosi in MTHFR C677T nelle donne con aborti ricorrenti, e l'eterozigosi dei geni del Fattore V Leiden, ACE, e apo-E2 a entrambi i genitori svolgono un ruolo cruciale negli aborti ricorrenti e dovrebbero essere considerati come un fattore di rischio. Gli attuali risultati dimostrano che la perdita ricorrente di gravidanza è legata alle combinazioni delle mutazioni nei gene trombofilici di entrambi i genitori.

BIBLIOGRAFIA

Poort et al. 1996 Blood 88: 3698-3703; Bertina et al. (1994) Nature 369: 64-67; Castoldi et al. (2000), Blood 96: 1443-1448; Lunghi 1996 Thromb Haemost.;75:45-48; Kohler (1998) Thromb Haemost 79, 8; van't Hooft (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 3063; Newman (1989) J Clin Invest 83, 1778; Dawson (1993) J Biol Chem 268, 10739; Rigat (1990) J Clin Invest 86, 1343; Frosst et al. (1995) Nature Genet. 10: 111-113; Van der Put et al. (1998) Am. J. Hum. Genet. 62: 1044-1051; Leclerc (1966) Hum. Molec. Genet. 5: 1867-1874; Soria (1989) Proc Natl Acad Sci U S A 86, 587; Weisgraber, 1981, J. Biol. Chem. 256: 9077-9083; Rall, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 4696-4700; Das, 1985, J. Biol. Chem. 260: 6240-6247; Paik, 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3445-3449.