

## Alleli G20210A e G1691A dei geni della protrombina e del fattore V: la complessità della patologia tromboembolica\*

Raffaella Sibillo, Francesca Pizza, Angela Sibillo, Antonella Fuccio  
Laboratorio di emostasi e trombosi  
Hermes S.r.l. Centro Medico Polispecialistico, Caserta

### ABSTRACT

#### G20210A prothrombin variant and G1691A factor V Leiden: the complexity of the thromboembolic disease

We described three pedigrees including heterozygous and homozygous subjects for prothrombin and factor V mutations. The probands of each family, heterozygous for factor V Leiden and homozygous for G20210A prothrombin mutation, suffered of deep-vein thrombosis, recurrent phlebitis and one event of cerebral ischemia. None of relatives in all families have had thromboembolic disease, even if have been exposed to genetic risk factors and circumstantial risk factor such as pregnancy, surgical procedures and use of oral contraceptive. These cases suggest that the genotype/phenotype correlation may not be as strong as described and support the complexity of thromboembolic disease. Individuals heterozygous or homozygous for the same mutant gene exhibit symptoms or non although they have been exposed to risk factors.

### RIASSUNTO

Nel nostro studio descriviamo tre famiglie con soggetti eterozigoti ed omozigoti per il fattore V Leiden e/o la mutazione G20210A del gene della protrombina. I probandi delle tre famiglie, portatori di trombofilia ereditaria, hanno manifestato trombosi venose profonde, tromboflebiti superficiali ricorrenti ed un evento di ischemia cerebrale. Nessuno dei restanti membri delle tre famiglie ha manifestato complicanze tromboemboliche venose, pur essendo esposti a fattori di rischio genetici e a fattori di rischio transitori come gravidanza, interventi chirurgici, uso di contraccettivi orali. Individui eterozigoti o omozigoti per la stessa mutazione presentano manifestazioni cliniche diverse, sebbene siano esposti agli stessi fattori di rischio. Ciò supporta ulteriormente la complessità della malattia tromboembolica.

### INTRODUZIONE

Nei paesi occidentali, la malattia tromboembolica venosa è un problema sanitario di notevole importanza e di frequente riscontro nella pratica clinica con un'incidenza annuale, nella popolazione generale, stimata intorno a 1-3 casi per 1000 abitanti (1). Il termine trombofilia descrive una tendenza, determinata da cause congenite o acquisite, al tromboembolismo venoso e/o arterioso, che tipicamente è caratterizzata dalla comparsa di manifestazioni cliniche in età giovanile (prima di 45 anni), senza cause apparenti e con la tendenza a recidivare (2). Lo stato trombofilico si esprime con la predisposizione all'insorgenza di complicanze trombotiche venose, quali trombosi venosa profonda e flebiti superficiali ricorrenti, o complicanze arteriose come l'infarto del miocardio e l'ischemia cerebrale, o complicanze della gravidanza. L'esistenza di uno stato trombofilico non implica necessariamente la presenza continua di manifestazioni cliniche di natura trombotica; ma è la sinergia tra fattori di rischio ereditari e

condizioni di rischio transitorie (gravidanza, stati post-operatori, immobilizzazione prolungata, traumi, uso di estrogeni) che gioca un ruolo chiave nell'insorgenza dell'evento trombotico venoso o arterioso (3).

Diversi difetti genetici sono stati associati ad un rischio incrementato di trombosi venosa. La carenza o anomalia degli anticoagulanti naturali, come l'Antitrombina III, la Proteina C e la Proteina S, è stata la prima ad essere identificata come causa di trombofilia (4-6). Questi difetti biochimici sono presenti solo in un 5-10% dei casi con storia di trombofilia familiare (7). Nell'ultimo decennio, due più comuni alterazioni genetiche sono state associate agli stati di ipercoagulabilità: la mutazione G1691A del gene del fattore V (fattore V Leiden) e la mutazione G20210A del gene della protrombina. Il fattore V Leiden è caratterizzato dalla sostituzione di una guanina in posizione 1691 con una adenina e pertanto dell'arginina 506 con una glutammina; ciò impedisce il taglio da parte della Proteina

\*Lavoro vincitore del premio D. Fenili assegnato in occasione di "SIBioC 2003, 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze 14-17 Ottobre 2003

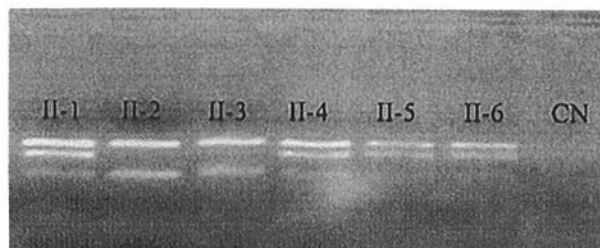
C attivata (8). Ne consegue una resistenza alla Proteina C attivata (APC) ed una maggiore attività pro-coagulante del fattore V attivato con predisposizione alla trombosi. Il fattore V Leiden è molto frequente nella popolazione caucasica Europea e Nord Americana con una prevalenza del 5% nella popolazione generale, del 15-20% nei pazienti non selezionati con trombofilia e del 50% nei pazienti con una storia familiare di tromboembolismo venoso (9). I soggetti eterozigoti per il fattore V Leiden hanno un rischio 10 volte superiore di sviluppare un episodio tromboembolico, mentre gli omozigoti 50-100 volte (8, 10). La mutazione G20210A del gene della protrombina è determinata dalla sostituzione di una adenina con una guanina in posizione 20210 della regione 3' non tradotta del gene, questa è associata con alti livelli plasmatici di protrombina (11). L'allele mutato è stato riscontrato nel 2% degli individui sani e nel 7% dei pazienti con tromboembolismo venoso. Pertanto, la mutazione G20210A del gene della protrombina rappresenta il secondo più comune fattore di rischio per tromboembolismo venoso ed incrementa il rischio di trombosi di almeno 3 volte (12, 13). Il rischio tromboembolico aumenta notevolmente nel caso in cui vengano ereditate più alterazioni geniche responsabili di trombofilia: pazienti portatori sia del fattore V Leiden che dell'allele 20210A del gene della protrombina hanno un rischio trombotico incrementato di 40 volte (14). Alcuni studi suggeriscono che i portatori di difetti genetici multipli possono sviluppare eventi trombotici in età giovanile, in distretti inusuali ed in assenza di fattori di rischio acquisiti o ambientali (15).

Nel nostro studio descriviamo tre nuclei familiari, in cui sono presenti soggetti con lo stesso genotipo trombofilico, ma con diversa espressione clinica.

## MATERIALI E METODI

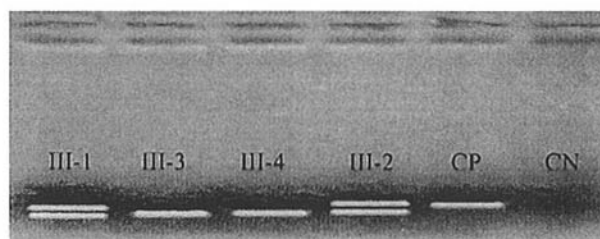
Le indagini di biochimica clinica sono state eseguite su campioni di sangue raccolti, con il sistema vacutainer, in provette contenenti citrato trisodico 0.129M e centrifugati a 2000g per 15 minuti fino ad ottenere un plasma povero di piastrine. PT, aPTT, fibrinogeno, antitrombina III, Proteina S totale (metodo coagulativo, STA Roche) e libera (metodo immuno-turbidimetrico, Stago-Roche), Proteina C, resistenza alla Proteina C attivata (metodo coagulativo, Instrumentation Laboratory), t-PA, PAI-I (EIA, Byc diagnostica) ed omocisteina (HPLC, Microlina) sono stati eseguiti su tutti i pazienti.

Il DNA genomico è stato estratto da cellule nucleate del sangue periferico (kit Amersham Nucleon BACC2). Le regioni geniche, in cui sono localizzate le mutazioni G1691A e G20210A dei geni del fattore V e della protrombina, vengono amplificate con metodica PCR (Polymerase Chain Reaction), mediante l'impiego di specifiche coppie di oligonucleotidi (8, 11); successivamente i prodotti amplificati sono digeriti con specifici enzimi di restrizione (MnII e HindIII rispettivamente) e visualizzati su gel di agarosio al 3% (figure 1 e 2). Tutte le procedure analitiche descritte prevedono la contemporanea analisi di campioni di DNA di controllo e la conferma (figura 3) dei risultati con metodica ARMS - Amplification Refractory Mutation Detection (16).



**Figura 1**

Fattore V Leiden nella famiglia II. I pazienti 1, 4, 5 e 6 risultano eterozigoti per la mutazione G1691A del fattore V. I pazienti 2 e 3 non presentano tale mutazione. CN: controllo negativo (assenza del DNA)



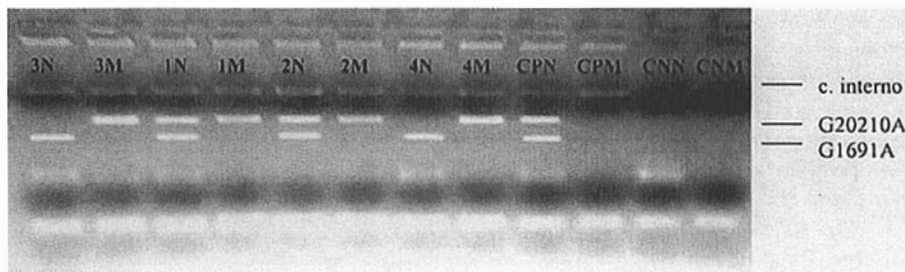
**Figura 2**

Mutazione G20210A del gene della protrombina nella famiglia III. I pazienti 1 e 2 risultano eterozigoti per la mutazione G20210A del gene della protrombina, i pazienti 3 e 4 sono omozigoti per la stessa mutazione. CP: controllo positivo non mutato. CN: controllo negativo (assenza del DNA)

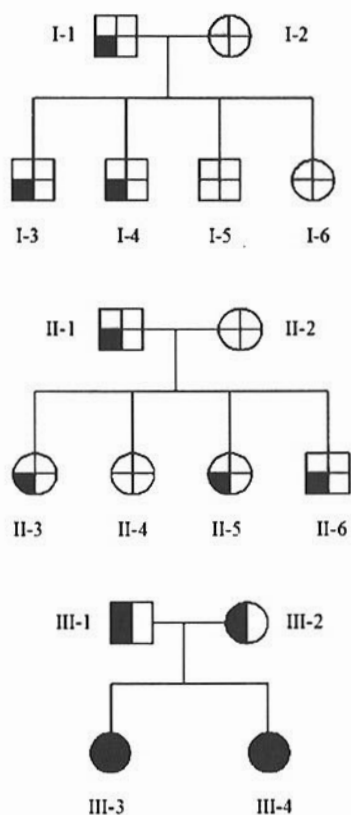
## RISULTATI

**Famiglia I** (figura 4). Un uomo di 33 anni (I-5), in seguito ad un trauma sportivo, ha sviluppato una trombosi venosa profonda: l'ecocolordoppler venoso con compressione (CUS) ha confermato l'occlusione della vena poplitea destra. Il paziente è stato trattato immediatamente con eparina a basso peso molecolare. Alle indagini ematochimiche e molecolari il paziente è risultato portatore della mutazione G1691A del gene del fattore V (fattore V Leiden) in eterozigosi. Lo screening per trombofilia è stato esteso agli altri membri della famiglia: la madre (I-2) e la sorella (I-6) sono risultate eterozigoti per il fattore V Leiden, il padre (I-1) e i due fratelli (I-3 e I-4) sono eterozigoti per l'allele 20210A del gene della protrombina. Nessun componente del nucleo familiare ha mai manifestato eventi tromboembolici sebbene siano stati sottoposti a fattori di rischio comuni quali gravidanza, interventi chirurgici e traumi sportivi.

**Famiglia II** (figura 4). Una donna di 35 anni (II-4) riferisce di aver manifestato flebiti superficiali ricorrenti all'età di 27 anni, immediatamente dopo la sua seconda gravidanza ed un episodio di ischemia cerebrale in seguito ad un intervento chirurgico espletato in anestesia generale all'età di 33 anni. La paziente allo screening trombofilico è risultata portatrice del fattore V Leiden in eterozigosi. La sorella più giovane (II-5), eterozigote per le mutazioni G1691A e G20210A, ha avuto un aborto spontaneo nel primo trimestre di gravidanza. La sorella più anziana (II-3),



**Figura 3**  
Mutazioni G1691A del gene del fattore V e G20210A del gene della protrombina con metodica ARMS (Amplification Refractory Mutation Detection). I pazienti 3 e 4 risultano omozigoti, i pazienti 1 e 2 risultano eterozigoti per la mutazione G20210A del gene della protrombina. Tutti i pazienti non presentano la mutazione G1691A del gene del fattore V. CP: controllo positivo non mutato. CN: controllo negativo (assenza del DNA). N: allele non mutato. M: allele mutato



**Figura 4**  
Albero genealogico riferito ad ognuna delle famiglie analizzate. Grigio: fattore V Leiden. Nero: protrombina G20210A

eterozigote per la mutazione G20210A, non ha manifestato eventi tromboembolici, nonostante abbia portato a termine due gravidanze e abbia sostenuto un intervento chirurgico in anestesia generale. Infine, il fratello (II-6), eterozigote per la mutazione G1691A, non ha sviluppato episodi di trombosi, pur essendo uno sportivo sottoposto a diversi traumatismi. Il padre (II-1) è risultato eterozigote per le mutazioni G1691A e G20210A e riferisce un infarto del miocardio all'età di 47 anni. Per la madre (II-2) sono

state escluse entrambe le mutazioni.

**Famiglia III** (figura 4). Una donna di 27 anni (III-3), dopo alcune ore dal secondo parto cesareo in anestesia loco-regionale subaracnoidea, ha manifestato un marcato edema dell'arto inferiore sinistro. È emersa assenza di flusso a carico dell'asse popliteo-femorale ed iliaco prossimale (iliaca esterna e comune prossimale) di sinistra con totale incompressibilità dei vasi esplorati all'ecocolordoppler venoso con compressione (CUS). La paziente ha sospe-

so l'allattamento ed ha iniziato la terapia con eparina a basso peso molecolare, successivamente ha continuato la terapia con anticoagulanti orali fino alla totale risoluzione della trombosi.

L'analisi del DNA ha escluso la presenza del fattore V Leiden mentre ha evidenziato la mutazione G20210A in omozigosi. Alla luce di tali evidenze, lo screening per trombofilia è stato esteso ai genitori ed alla sorella della paziente. I genitori (III-1 e III-2) sono risultati entrambi eterozigoti per l'allele 20210A, mentre la sorella (III-4) ha presentato lo stesso genotipo della paziente. La famiglia non presenta una storia di malattia tromboembolica. Inoltre, tutti i componenti sono stati esposti nel corso della loro vita a diversi fattori di rischio, quali intervento chirurgico in anestesia generale ed immobilizzazione prolungata (il padre), gravidanza e parto (la madre e la paziente) ed assunzione di estro-progestinici (la sorella e la paziente nell'intervallo tra le due gravidanze). Tutti i risultati sono riportati nella tabella 1.

**DISCUSSIONE**

Tutti i componenti dei nuclei familiari, da noi analizzati, sono stati esposti sia a fattori di rischio genetici che transitori comuni; inoltre, almeno un componente (probando) ha manifestato un episodio trombotico. Il probando della famiglia I (I-5, 1691G/A) ha sviluppato una trombosi venosa profonda dell'arto inferiore in seguito ad un trauma sportivo; il probando della famiglia II (II-4, 1691G/A) ha riportato episodi ricorrenti di tromboflebite superficiale dopo la seconda gravidanza ed un episodio di ischemia cerebrale in seguito ad un intervento chirurgico; infine, il probando della famiglia III (III-3, 20210A/A) ha manifestato una trombosi venosa profonda dell'arto inferiore dopo il parto cesareo. In questi pazienti, l'associazione delle condizioni favorevoli sopra riportate come fattori scatenanti degli eventi trombotici in soggetti portatori di alterazioni genetiche trombofiliche sembra essere una ulteriore prova della patogenesi multifattoriale delle tromboembolie venose.

L'attività sportiva generalmente previene la trombosi,

**Tabella 1**

Dati clinici e di laboratorio delle tre famiglie portatrici delle mutazioni dei geni della protrombina (G20210A) e del fattore V (G1691A)

Famiglie	Età (anni)	Genotipo	Storia di trombosi	Fattori di rischio
I-1	71	20210G/A	NO	Intervento chirurgico
I-2	64	1691G/A	NO	Gravidanza (4) Intervento chirurgico
I-3	41	20210G/A	NO	-
I-4	36	20210G/A	NO	Attività sportiva
I-5	33	1691G/A	Trombosi venosa profonda	Attività sportiva
I-6	30	1691G/A	NO	Gravidanza (1)
II-1	70	20210G/A 1691G/A	Infarto del miocardio	-
II-2	61	No mutazioni	NO	Gravidanza (4)
II-3	37	20210G/A	NO	Gravidanza (2) Intervento chirurgico
II-4	35	1691G/A	Flebiti ricorrenti ischemia cerebrale	Gravidanza (2) Intervento chirurgico
II-5	29	20210G/A 1691G/A	aborto spontaneo	Intervento chirurgico Gravidanza (1)
II-6	25	20210G/A 1691G/A	NO	Attività sportiva Intervento chirurgico
III-1	45	20210G/A	NO	
III-2	43	20210G/A	NO	Gravidanza (2)
III-3	25	20210A/A	Trombosi venosa profonda	Gravidanza (2) Contraccettivi orali
III-4	20	20210A/A	NO	Contraccettivi orali

ma i traumatismi caratteristici dello sport possono favorire l'insorgenza di episodi tromboembolici nei soggetti trombofilici (17). E' ciò che si è verificato per il probando della famiglia I (I-5, 1691G/A), ma non per il fratello (I-4) eterozigote per la mutazione G20210A del gene della protrombina o per il paziente II-6 portatore degli alleli 1691A e 20210A in eterozigosi. In quest'ultimo caso il rischio trombotico dovrebbe essere superiore a quello del paziente I-5 per la presenza di due fattori di rischio genetici.

La gravidanza determina fisiologicamente uno stato protrombotico con un incremento dei fattori procagulanti ed un decremento degli inibitori fisiologici della coagulazione. Le donne trombofiliche hanno un rischio incrementato di complicanze della gravidanza come l'aborto precoce o tardivo ricorrente, la pre-eclampsia, la morte fetale, il distacco di placenta, la trombosi venosa e le tromboflebiti superficiali ricorrenti (18). Tale rischio risulta ulteriormente aumentato per le donne portatrici di difetti genetici multipli (19). La paziente II-5, portatrice in eterozigosi delle mutazioni G1691A e G20210A, ha riportato un aborto spontaneo nel primo trimestre di gravidanza; la paziente II-4, eterozigote per il fattore V Leiden ha sviluppato flebiti superficiali ricorrenti immediatamente dopo la seconda gravidanza, mentre la prima gravidanza è intercorsa senza l'insorgenza di alcuna complicanza. La paziente III-3 (omozigote per l'allele 20210A) ha sviluppato una trombosi venosa profonda dell'arto inferiore immediatamente dopo il parto cesareo. Individui omozigoti per difetti gene-

tici trombofilici hanno una più alta probabilità di sviluppare una patologia trombotica rispetto ad individui eterozigoti per la stessa alterazione (20). Con ciò si potrebbe spiegare l'assenza di manifestazioni cliniche trombotiche nelle pazienti III-2 e II-3 che hanno avuto due gravidanze senza complicanze, ma non nella paziente III-4, la quale non ha avuto ad oggi gravidanze, ma ha fatto uso per diversi anni di estroprogestinici, che incrementano il rischio di malattia tromboembolica (21). Il tromboembolismo venoso sembra manifestaarsi in in-

dividui trombofilici in maniera diversa, probabilmente a causa della presenza di fattori ancora sconosciuti, favorenti l'una o l'altra manifestazione clinica.

Le famiglie da noi studiate, sebbene siano limitate per poter trarre delle conclusioni generalizzate, ci hanno consentito di evidenziare una diversa espressione clinica in presenza di genotipi analoghi. Ciò potrebbe indurre qualcuno a dubitare della reale necessità di estendere lo screening per trombofilia a tutta la famiglia del caso indice. In ogni caso, finché non si riusciranno ad individuare tutti i fattori di rischio scatenanti un evento tromboembolico, lo screening familiare è necessario. Solo l'identificazione precoce di portatori ancora asintomatici consente di adottare le giuste misure profilattiche di tipo antitrombotico durante l'esposizione a fattori di rischio e scongiurare in questo modo l'episodio trombotico. Allo stesso tempo consente di escludere i soggetti non portatori per i quali non sarà mai intrapresa alcuna terapia profilattica. Il costo sostenuto per lo screening familiare è sicuramente bilanciato dalla prevenzione dei costi per il trattamento delle complicanze tromboemboliche, che si verificherebbero senza l'intervento diagnostico e terapeutico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Goldhaber SZ. Epidemiology of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. In: Bloom AL, Forbe CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. Haemostasis and thrombosis. 3rd

- ed. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone 1994; 1327-1333.
2. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP et al. Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651.
  3. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.
  4. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13:516-30.
  5. Griffin J, Evatt B, Zimmerman T, Kleiss A, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68:1370-3.
  6. Comp P, Esmon C. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984; 311:1525-8.
  7. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996; 87:3531-44.
  8. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
  9. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-34.
  10. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
  11. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698.
  12. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G et al. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000; 111:1223-9.
  13. Hillarp A, Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B. The 20210A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 990-992.
  14. Koeleman BPC, Reitsma PH, Bertina RM. Familial Thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Haematol* 1997; 34: 256-264.
  15. Zoller B, De Frutos PG, Hillarp A, Dahlback B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999; 84: 59-70.
  16. Mitterer M, Lanthaler AJ, Mair W, Giacomuzzi K, Coser P. Simultaneous detection of FV Q506 and prothrombin 20210A variation by allele specific PCR. *Haematologica* 1999; 84: 204-7.
  17. Hilberg T, Jeschke D, Gabriel HH. Hereditary thrombophilia in elite athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 218-21.
  18. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-am A et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 9-13.
  19. Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, Paciaroni K, Rossi E et al. Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. *Thromb Hemost* 2002; 87: 791-5.
  20. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, D'Orazio A, Cina G et al. Different circumstances of the first venous thromboembolism among younger or older heterozygous carriers of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Haematologica* 2003; 88: 61-66.
  21. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Higher risk of venous thrombosis during early use of oral contraceptives in women with inherited clotting defects. *Arch Intern Med* 2001; 161: 484-5.