

## Diagnosi di iperomocisteinemia partendo da un alterato quadro coagulativo intermittente: importanza dello screening emocoagulativo e genetico

Maria Cristina Martorana<sup>1</sup>, Manuela Testi<sup>2</sup>, Alessandra Moscetti<sup>3</sup>, Rossella Leone<sup>3</sup>, Renata Rosati<sup>2</sup>, Angelos Psimenos<sup>4</sup>, Emilio Mannella<sup>1</sup>, Leonardo Marinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Aziendale Produzione Emocomponenti, A.O. San Camillo, Forlanini, Roma

<sup>2</sup>Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione Istituto Mediterraneo di Ematologia, Roma

<sup>3</sup>Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, A.O. San Camillo, Forlanini, Roma

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze dell'Invecchiamento, UdS "La Sapienza", Roma

### ABSTRACT

**Diagnosis of iperhomocysteinemia beginning from an intermittent altered coagulation picture: the importance of genetic and coagulation screenings.** The Authors present an interesting clinical case of an Italian Red Cross periodic thrombocytapheresis donor family (three brothers and parents). Before the platelet donation, the propositus (one of the brothers) showed alternated between altered and normal coagulation tests (prothrombin time - PT, activated thromboplastin time - APTT). A biochemical and coagulation study showed other altered coagulation values (FVII) and elevated concentrations of homocysteine, that is a strong and independent risk factor for coronary artery disease (CAD). After a two months therapy, the biochemical and coagulation values of the propositus returned within the reference values. Since the variations of clotting factor values are particularly relevant to the development of CAD, the Authors examined the family components testing for inherited coagulation disorders and other associated genetic polymorphisms.

### INTRODUZIONE

Riscontri crescenti accertano che la malattia aterosclerotica coronarica (Coronary Atherosclerotic Disease -CAD-) sia una malattia poligenica in cui coesistono varie alterazioni causando precoci e gravi manifestazioni cliniche.

Elevati livelli di omocisteina nel plasma rappresentano un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari. La condizione severa di iperomocisteinemia è rara, mentre la forma lieve è presente nel 5-7% della popolazione<sup>1,2</sup>.

Diversi studi epidemiologici<sup>3-6</sup> hanno mostrato l'indipendenza della iperomocisteinemia, anche in forma moderata e/o leggermente elevata, quale fattore di rischio nella malattia cardiovascolare, oltre che in molte altre patologie. Tale condizione sembrerebbe derivare da fattori nutrizionali e/o da mutazioni di geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina<sup>7</sup>.

Una delle mutazioni<sup>4</sup> riguarda l'enzima 5-10-metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), il cui ruolo è quello di convertire il 5-10 metilentetraidrofolato, donatore di gruppi metilici nella reazione di rimetilazione dell'omocisteina a metionina, a 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF). Le varianti genetiche di tale mutazione possono essere: la C677T che, a causa della sostituzione dell'alanina con una valina, dà origine ad una variante termolabile con ridotta attività enzimatica, ed una seconda variante genetica A1298C che produce la sostituzione di un glutamato con alanina<sup>8-10</sup>. La condizione di omozigosi della mutazione relativa può determinare una severa iper-

omocisteinemia e una differente penetranza del gene può portare pazienti, con questo tipo di deficit omozigote, ad un incrementato rischio di CAD. I soggetti, invece, con lieve iperomocisteinemia non mostrano segni clinici e sono tipicamente asintomatici sino alla terza o quarta decade di vita, quando si può sviluppare una malattia cardiovascolare con ricorrenti trombosi arteriose o venose. Pazienti portatori di entrambe le mutazioni suddette, presentano un rischio più elevato di CAD, in seguito ad un incremento della concentrazione di omocisteina maggiore rispetto ai portatori delle singole mutazioni.

Rispetto ad altri polimorfismi genetici coinvolti nell'attività coagulativa, la condizione di portatore di mutazioni nel locus relativo all'apolipoproteina B-100 (Apo B) può rappresentare un rischio sette volte superiore di sviluppare un infarto rispetto alla popolazione normale<sup>11</sup>; mentre, per quanto riguarda il sistema antigenico piastrinico HPA-1 (Human Platelet Antigen 1), la condizione di eterozigosi (HPA-1a/1b) o di omozigosi (HPA-1b/1b) espone ad uno stato trombofilico dovuto alla presenza di piastrine maggiormente aggreganti con conseguenti patologie cardiovascolari<sup>12</sup>.

Il caso presentato in questo studio riguarda un donatore periodico di concentrati piastrinici in aferesi, i suoi due fratelli, anch'essi donatori, ed i genitori.

Durante la selezione per la donazione aferetica, il propositus, inaspettatamente, presentava valori alterati ai test coagulativi di routine. Richiamato, presentava quadri coagulativi di routine a volte normali a volte alterati.

Ulteriori controlli rilevavano iperomocisteina, nonché

bassi livelli di alcuni fattori della coagulazione. Nel tentativo di rivelare possibili associazioni coagulative e genetiche di questa famiglia di donatori con probabile rischio di patologie cardiovascolari, il propositus e l'intera famiglia sono stati studiati per i seguenti polimorfismi: F V Leiden, protrombina 20210A/G, MTHFR, HPA 1a/b, Apo B. Inoltre, sono stati eseguiti test di screening in coagulazione.

## MATERIALI E METODI

I campioni di sangue per i test coagulativi sono stati raccolti in provette S-Monovette 9NC (Sarstedt, Italia)<sup>13</sup>, per le indagini genetiche e la misura dell'omocisteina in EDTA-K3 (Becton Dickinson, Italia). Il plasma, raccolto dopo centrifugazione a 2000xg per 20 minuti, è stato immediatamente esaminato. Le analisi emocoagulative sono state eseguite utilizzando reagenti, metodiche e apparecchiature della ditta IL (Instrumentation Laboratory S.p.A., Milano - Italia) con sistema ottico - nefelometrico semiautomatico per ACL -300 e ottico - turbidimetrico automatico per ACL - FUTURA Plus (IL S.p.A., Milano - Italia). Il kit PT-FIB-HS-PLUS<sup>14</sup> impiegato per la determinazione del tempo di protrombina (PT), del fibrinogeno (FBG) e del FVII<sup>15</sup>, fornito dalla ditta IL, utilizza una tromboplastina liofilizzata estratta dal cervello di coniglio ed una quantità ottimale di ioni calcio. La tromboplastina calcica ha una elevata sensibilità per la determinazione simultanea del Tempo di Protrombina e della concentrazione del fibrinogeno (Fibrinogeno- PT derivato) e permette la valutazione della via estrinseca della coagulazione, in particolare del FVII. Il dosaggio della omocisteina è stato eseguito con IMX (Abbott, Italia), mentre le indagini molecolari sono state effettuate con un test che permette la rilevazione su striscia delle sei principali mutazioni geniche associate a malattie cardiovascolari (kit offerto da Nuclear Laser Medicine, Italia). Il DNA genomico è stato estratto da 5 mL di sangue periferico utilizzando la metodica del Salting Out<sup>16</sup> e amplificato secondo il protocollo del kit. Durante la reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction) sono stati incorporati nucleotidi biotinilati nei frammenti di DNA amplificato. Il prodotto di amplificazione, dopo denatura-

zione, è stato ibridato con le sonde specifiche per i polimorfismi studiati, immobilizzate come linee parallele su strisce di membrana di nylon. Successivamente all'ibridazione ed al lavaggio di stringenza, entrambi eseguiti a 45°C, la visualizzazione colorimetrica è stata ottenuta mediante streptavidina marcata con fosfatasi alcalina e NBT/BCIP come cromogeno. Il genotipo dei campioni in esame è stato dedotto dai patterns di ibridazione osservati, messi in correlazione con la specificità delle sonde usate.

## RISULTATI

In tabella I sono riportati i valori delle indagini emocoagulative che mostrano un allungamento del tempo di protrombina (PT) nel propositus e nel padre ed un abbassamento dei livelli plasmatici di FVII, mentre la Ratio del tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) ed i fattori V, VIII, XII risultavano normali anche per gli altri membri della famiglia. In tabella II sono riportati i risultati delle indagini genetiche, che hanno evidenziato la presenza di alcuni polimorfismi e in particolare: una mutazione 677TT (omozigote) per l'enzima MTHFR nel donatore, nel padre ed in un fratello; due mutazioni in eterozigosi (677CT e 1298AC) per il polimorfismo MTHFR nella madre ed una mutazione in eterozigosi (HPA 1a/1b) per il sistema antigenico piastrinico HPA-1 nella madre e in un figlio. Il dosaggio dell'omocisteina sul siero ha rilevato una iperomocisteinemia con valori di omocisteina del propositus inizialmente di 46,2 µmol/L e, successivamente di 8,5 µmol/L dopo terapia (Folac: 0.4 µg/die; Folina capsule 5 mg: 2capsule /die; Benadon compresse 300 µg: 1 capsula a giorni alterni).

Infine, l'intero nucleo familiare non ha rivelato mutazioni di FV Leiden, all' Apo-B, e di FII mutato, risultando tutti i soggetti wild type (WT), come riportato in tabella II.

## DISCUSSIONE

E' noto che la quantità di omocisteina circolante, sia quella transulfurata a cistationina che quella rimetilata a metionina, dipende anche dalla metionina presente negli alimenti. Ma, poiché l'omocisteina è altamente citotossi-

**Tabella 1**  
Valori emocoagulativi

	PT- INR (0.82-1.18) FXII%	APTT-R (0.74-1.30) (0.74-1.30)	FV%	FVII%	FVIII%	FXII%
PROPOSITUS 29aa	1.33	1.20	71	53	74	93
FRATELLO I 45aa	1.08	1.25	78	103	68	102
FRATELLO II 41aa	1.14	1.11	66	85	76	76
PADRE 78aa	1.19	1.03	80	70	92	89
MADRE 69aa	1.06	1.00	80	110	148	132

PT-INR: Tempo di protrombina - Rapporto Normalizzato Internazionale  
APTT-R: Ratio di Tempo di Tromboplastina Attivato

**Tabella 2**  
*Polimorfismi Genetici*

	C677T MTHFR	A1298C MTHFR	R3500Q APO B	R506Q FV	G20210A FII	HPA-1
Propositus	677TT	wt	wt	wt	wt	1a/1a
Madre	677TT	1298AC	wt	wt	wt	1a/1b
Fratello I	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Fratello II	677TT	wt	wt	wt	wt	1a/1a
Padre	677TT	wt	wt	wt	wt	1a/1b

wt = wild type

NT = non testato

ca, la sua concentrazione deve essere mantenuta costantemente bassa mediante il catabolismo e dal suo meccanismo di trasporto cellulare all'interno del plasma. Inoltre, l'iperomocisteinemia interferisce con il sistema coagulativo con effetti protrombotici ed incrementa la possibilità di morte per infarto<sup>17-19</sup>

Nel programma europeo di protezione, la soglia di definizione è di 12  $\mu\text{mol/L}$  per l'omocisteinemia. Il Framingham Heart Study, ha dimostrato che con una omocisteinemia superiore a 11,4  $\mu\text{mol/L}$ , il rischio cardiovascolare era incrementato.<sup>20,21</sup>

L'alterato quadro coagulativo e le mutazioni trovate in tutta la famiglia rappresentano un fattore di rischio per la malattia trombotica<sup>22,23</sup>. Inoltre, durante l'anamnesi, la madre del propositus riferiva precedenti episodi di tromboflebite superficiale e di trombosi venosa profonda, a cui non si era data spiegazione.

L'iperomocisteinemia del propositus, è classificata come intermedia<sup>1,20</sup> per il suo valore compreso nell'intervallo 30 - 100  $\mu\text{mol/L}$ . Essa, si è rivelata alla nostra attenzione tramite un cambiamento del regime dietetico in quanto il donatore era divenuto militare di leva.

Nel propositus, i valori di omocisteina, dopo due mesi di terapia con somministrazione di folati, vitamina B6 sono rientrati nei valori fisiologici.

I bassi valori plasmatici di F VII, riscontrati sia nel propositus che in altri due membri della famiglia, fanno supporre che il rischio trombotico di questi pazienti, eventualmente portato dalla mutazione 677TT dell'enzima MTHFR, potrebbe essere bilanciato dalla presenza di eventuali polimorfismi del FVII, che sono in corso di studio<sup>24-29</sup>.

La possibilità che diversi polimorfismi possano essere contemporaneamente evidenziati sullo stesso individuo non è rara: l'azione di polimorfismi associati a rischio trombotico, può essere bilanciata dalla contemporanea presenza di polimorfismi geneticamente protettivi per la CAD<sup>24</sup>.

Nell'emofilia A, ad esempio, le manifestazioni emorragiche procurate dal deficit di FVIII possono essere bilanciate dalla contemporanea presenza della mutazione Leiden del fattore V<sup>30</sup>. In altri casi, la presenza di tale mutazione, associata a manifestazioni trombotiche, viene bilanciata dalla presenza del polimorfismo del fattore VII che esercita una azione protettiva per CAD<sup>23</sup>.

Nella madre del propositus, oltre ad un elevato valore plasmatico di FVIII:c, l'analisi genetica ha rilevato la presenza di entrambe le mutazioni per MTHFR (677CT/1298AC). Condizione di eterozigosi, questa, che comporta una riduzione del 36% dell'attività specifica dell'enzima. Pazienti portatori di entrambe le mutazioni, infatti, presenterebbero un rischio maggiore di CAD ed un incremento dei tassi di omocisteina più elevati rispetto alle singole mutazioni<sup>31</sup>.

In due soggetti (madre ed un figlio) è stata evidenziata la presenza degli alleli 1a e 1b del sistema HPA-1, che può comportare uno stato di trombofilia<sup>22,32,33</sup> dovuto alla presenza di piastrine maggiormente aggreganti.

I soggetti sono stati informati sulla loro condizione di rischio e degli episodi trombotici pregressi, presenti nelle loro anamnesi, che erano rimasti incompresi come gli eventi di tromboflebite superficiale e di trombosi venosa profonda della madre.

Questo studio, originatosi da una osservazione casuale, ha permesso di evidenziare una condizione familiare di rischio aterotrombotico sconosciuto fino a quel momento e di poter quindi predisporre interventi terapeutici di prevenzione.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori sono estremamente grati al Dott. A. Morgillo, al Dott. V. Ignacchiti della Nuclear Laser Medicine - s.r.l., per i kit offerti per la rilevazione delle mutazioni geniche associate a malattie cardiovascolari.

## BIBLIOGRAFIA

1. Welch GN, Loscalzo J: Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998; 338:1042-1050.
2. Mayer EL, Jacobsen DW: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:517-527
3. Rozen R.: Genetic Predisposition to Hyperhomocysteinemia: Deficiency of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *Thrombosis and Haemostasis*1997;78: 523 - 531
4. Boushey C, Beresford SAA, Omenn GS, et al.: A quantitative assessment of plasma homocysteine as risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274: 1049 - 1059
5. Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, Nygard O, Nordrehaug JE, et al: Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland

6. Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(1):130-136
7. Malinow MR: Plasma concentrations of total homocysteine predict mortality risk. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(1): 3
8. Panunzio M, Brunetti G: Omocisteina plasmatica: da semplice curiosità biochimica a fattore di rischio nutrizionale. Una overview. *Biologi Italiani* 2003, 4:24-28
9. Rozen R: Genetic Modulation of Homocysteinemia. *Seminars in Trombosis and Hemostasis*, 26, 255, 2000.
10. Van der Put NMJ, Fons G, Stevens EMB et al.: A Second Common Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *Am J Hum Genet*, 62,1044, 1998.
11. Brenner B, Blumenfeld Z: Thrombophilia and fetal loss. *Blood Reviews*, 11, 72, 1997.
12. Ruzicka V, Marz W, Russ A et al.: Apolipoprotein B(Arg<sup>3500</sup>→Gln) allele specific polymerase chain reaction: large - scale screening of pooled blood samples. *Journal of Lipid Research*, 33,1563, 1992.
13. Di Castelnuovo A, De Gaetano G, Donati MB et al.: Platelet Glycoprotein Receptor IIIa Polymorphism PIA1 / PIA2 and Coronary Risk: a Meta-Analysis *Thromb Haemost*, 85, 626, 2001.
14. Martorana MC, Marinelli L, Scocchera R: Influenza delle procedure preanalitiche nel laboratorio di coagulazione. *La Trasfusione del Sangue*, 47, 157, 2002.
15. Ray MJ, Smith IR: The Dependence of the International Sensitivity Index on the Coagulometer used to Perform the Prothrombin Time, *Thromb Haemost*, 63, 424,1990.
16. Humphries S, Temple A, Lane A et al.: Low plasma levels of FVII and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost*, 75, 567, 1996.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A Simple Salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 16,1215, 1988.
18. Yang Q et al.: Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 2006; 113: 1335-1343
19. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators: Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1-11
20. Bona KH, et al.: Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354: 1-11
21. Kelly PJ, Furie KL: Management and Prevention of Stroke Associated with Elevated Homocysteine. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2002; 4 (5): 363-371
22. Macy PA: Homocysteine: predictor of thrombotic disease. *Clin Lab Sci* 2001; 14 (4): 272-275
23. Bertina RM: Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 601 - 611
24. Degen. JL: Genetic Interactions between the Coagulation and Fibrinolytic Systems. *Tromb Haemost*, 86,130, 2001.
25. Lane DA, Grant PJ: Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial disease. *Blood*, 95, 1517, 2000.
26. Lane DA, Mollica LR: Haemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002,32: 213-215
27. Donati MB, Zito F, Di Castenuovo A et al.: Genes, coagulation and cardiovascular risk. *Journal of Human Hypertension*, 14,369, 2002.
28. Bernardi F, Marchetti G, Pinotti M et al.: Factor VII Gene Polymorphisms Contribute About One Third of the Factor VII Level Variation in Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16, 1996.
29. Iacoviello L, Zito F, Di Castenuovo A et al.: Contribution of factor VII, fibrinogen and fibrinolytic components to the risk of ischaemic cardiovascular disease: their genetic determinants. *Fibrinolysis e Proteolysis*, 12, 259, 1998.
30. Iacoviello L, Di Castenuovo A, De Knijff P et al.: Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 79-85.
31. Nichols WC et al.: Moderation of hemofiphilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. *Blood* 1996; 88: 1183-1186
32. Chango A, Boisson F, Barbe F, et al.: The effect of 677C→T and 1298 A→C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr*, 83, 593, 2000.
33. Simmonds RE, Hermida J, Rezende SM et al.: Haemostatic Genetic Risk Factors in Arterial Trombosis. *Thromb Haemost*, 86, 374, 2001.
34. Marinelli L, Scocchera R, Palumbo F et al.: Rischio ischemico e funzione emostatica: studio preliminare sul ruolo di parametri coagulativi in soggetti afferenti ad un progetto di prevenzione. *La Trasfusione del Sangue* 47, 457, 2002.