

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA
GENETICA E MEDICINA MOLECOLARE

XXI CICLO

Tesi di dottorato di ricerca

Fattori genetici di rischio trombotico

e

loro ruolo in patologia clinica.

Dottorando: dott. Pierpaolo **DI MICCO**

Tutor: Chiar.mo Prof. Giuseppe **CASTALDO**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carmelo Bruno **BRUNI**

INDICE

Abstract	2
Introduzione	6
<i>Trombofilia e ipercoagulabilità</i>	8
<i>Gli inibitori naturali della coagulazione</i>	12
<i>Carenze degli anticoagulanti naturali e trombosi</i>	15
<i>Altri stati trombofilici e trombosi</i>	17
<i>Iperomocisteinemia e patologia trombotica</i>	20
<i>Fattori acquisiti di rischio trombotico</i>	22
Scopi del progetto di ricerca	25
Pazienti e metodi	34
<i>Metodi</i>	34
<i>Pazienti</i>	35
<i>Gruppi di controllo</i>	38
Risultati	39
<i>Sindromi coronariche acute ad esordio giovanile e ad esordio non giovanile</i>	39
<i>Pazienti affetti da trombosi venosa profonda dell'arto superiore</i>	40
<i>Pazienti affette da poliabortività</i>	42
<i>Pazienti affetti da psudotumor cerebri</i>	42
<i>Pazienti affetti da tromboangioite obliterante (morbo di Buerger)</i>	43
<i>Pazienti con omozigosi per la variante A20210G della protrombina</i>	44
Discussione	46
Tabelle	54
Figure	67
Bibliografia	70

Abstract

Thrombosis is a multifactorial disease that may appear as arterial thrombosis and/or venous thrombosis. Several inherited and acquired risk factors are involved in the pathogenesis of a thrombotic event. Arterial acquired thrombotic risk factors are known since Framingham Study was developed and are mainly represented by aging, smoking, diabetes, dyslipidemia, hypertension. However, also familial history of arterial thrombosis was underlined as risk factor for arterial thrombotic events. On the other hand, venous thrombosis may be triggered by inherited or acquired thrombotic risk factors. Acquired thrombotic risk factors for venous thrombosis are represented by recent surgery, prolonged bed rest, cancer and its therapies, oral contraceptives use, pregnancy\puerperium and aging. However, also for venous thrombosis the presence of familial history of venous thrombosis is a well recognised thrombotic risk factor.

In the last years, a number of prothrombotic inherited risk factors have been described, as the deficiency of clotting inhibitors (i.e., antithrombin III, Protein C, Protein S), the resistance to inhibitors (i.e., Factor V Leiden), the reduced activity of fibrinolytic proteins or, finally, the increased activity of some procoagulant factors (i.e., A20210G variant of Factor II, etc.). Although it is well known the association between inherited thrombophilia and some thrombotic diseases as deep venous thrombosis and pulmonary embolism, controversial data are present on the association between inherited thrombophilia and other thrombotic diseases as the early onset acute coronary

syndrome, benign intracranial hypertension, deep venous thrombosis of upper limb and thromboangiitis obliterans.

The aim of our study was to select a large group of subjects bearing such thrombotic diseases, well characterised from the clinical and instrumental point of view and to analyze the possible role of a large panel of prothrombotic factors (i.e., AT III, PC, PS, FV Leiden, A20210G variant of FII, hyperhomocysteine and MTHFR mutations, etc.), as risk factors for such diseases.

In particular, our data revealed that: i) Buerger's disease is associated to hyperhomocysteinemia (frequently due to MTHFR gene variants); ii) juvenile myocardial infarction is associated to a higher occurrence of FVHR variant; iii) upper limb deep venous thrombosis is frequently associated to FV Leiden and hyperhomocysteinemia; iv) benign intracranial hypertension is also associated to a higher occurrence of FV Leiden and MTHFR gene variants. In addition, during our study, we identified six patients bearing the rare genotype of homozygosity for the A20210G variant of FII (about 60 patients described so far in the world); our study revealed that only four of the six cases developed thrombotic diseases while two did not experienced such diseases; we suggested that liver insufficiency (present in such two cases) may be a protective factor toward thrombotic diseases in patients bearing inherited thrombophilia.

These data may have a clinical impact, because: i) it is possible to use specific thromboprophylaxis to prevent thrombotic diseases in well defined

groups of high risk patients; ii) once identified a patient at risk for inherited prothrombotic conditions, the genetic counselling to the family permits to extend the analysis (and prophylaxis in the case) to other consanguineous that bear the same prothrombotic predisposition.

INTORDUZIONE

La patologia trombotica è una patologia multifattoriale in cui sono coinvolti fattori di rischio genetici e ambientali (1). Da un punto di vista fisiopatologico si è soliti distinguere gli eventi trombotici che interessano i distretti arteriosi da quelli dei distretti venosi. Le trombosi dei distretti arteriosi sono favorite infatti da fattori di rischio quali l'ipertensione arteriosa, le dislipidemie, il fumo, il diabete mellito, la viscosità ematica, l'aterogenesi, l'infiammazione e l'ipercoagulabilità (2-4); viceversa le trombosi dei distretti venosi sono favorite da processi fisiopatologici riassumibili nella triade di Virchow e cioè stasi ematica, danno\lesione parietale e ipercoagulabilità (1). Un unico fattore è quindi comune ai fattori di trombogenesi arteriosa e venosa: l'ipercoagulabilità. L'ipercoagulabilità è una condizione che costituisce una predisposizione, ossia una trombofilia, generata su base ereditaria o genetica, acquisita e/o combinata (5). Essa, dunque, è la base degli eventi trombotici clinicamente evidenti.

Distinguiamo diverse forme cliniche di trombosi arteriose a seconda dei distretti interessati, determinanti diversi quadri patologici: infarto del miocardio (distretto coronarico), stroke ischemico (distretti cerebrali), claudicatio intermittens (arteriopatie ostruttive degli arti inferiori).

Anche il tromboembolismo venoso riconosce diversi quadri clinici a seconda dei distretti interessati, trombosi venose profonde degli arti inferiori (distretti iliaco-femoro-popliteo-gemellare), trombosi venose profonde degli arti superiori (distretto succlavio-axillo-omerale), trombosi venose profonde di

altri organi (distretti splancnici), tromboembolie polmonari (distinguibili in primitive e secondarie).

Sono disponibili numerosi studi in letteratura che testimoniano l'associazione di alcuni eventi tromboembolici venosi, in particolare localizzati agli arti inferiori, in subsets di pazienti in giovane età e/o appartenenti allo stesso nucleo familiare e la loro associazione con un elevato numero di recidive trombotiche, indicando quindi quanto sia rilevante l'aspetto eredo-familiare nella patologia trombotica (6-7).

Viceversa, dati meno certi sono disponibili per altre patologie trombotiche come quelle venose localizzate agli arti superiori, o patologie venose di distretti atipici (ad esempio retina, distretti venosi cerebrali o distretti venosi splancnici).

Ancora meno univoci sono i dati della letteratura relativi all'associazione di alcune varianti geniche protrombotiche con patologie trombotiche quali le sindromi coronariche acute ad esordio giovanile, le aterotrombosi agli arti inferiori ad esordio giovanile e/o il morbo di Buerger, le trombosi dei distretti placentari determinanti abortività ripetuta.

Nel presente progetto ci siamo interessati di definire il ruolo di alcuni fattori protrombotici ereditari in diverse patologie dove tale ruolo era controverso o non definito.

Trombofilia e ipercoagulabilità.

Mentre è noto da secoli che difetti congeniti della coagulazione del sangue causano malattie emorragiche come l'emofilia, è solo da qualche decennio che si conoscono cause ereditarie di trombosi (trombofilia ereditaria). Come già detto, le manifestazioni cliniche della patologia trombotica si possono presentare sia a livello dei vasi venosi (trombosi venosa) che dei vasi arteriosi (trombosi arteriosa). La trombosi può verificarsi in assenza di cause scatenanti (primitiva o idiopatica) o in presenza di fattori di rischio (secondaria) (8-9).

La patologia trombotica venosa ha un'incidenza di 1:1000 casi/anno nella popolazione generale dei paesi occidentali e una prevalenza di 1:100 casi/anno nella popolazione selezionata per nuovi eventi clinici di trombosi venosa. Tale frequenza è pari alla frequenza di patologia trombotica arteriosa sebbene quest'ultima presenti anche altri fattori di rischio (ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, età, dislipidemie, diabete mellito) che alterano la parete vascolare facilitando il processo aterosclerotico e quindi l'aterotrombosi.

Per tali motivi, la patogenesi delle trombosi ereditarie viene comunemente associata alla patogenesi della trombosi venosa sebbene siano note manifestazioni trombotiche ereditarie del versante arterioso. Numerosi studi, infatti, riportano e sottolineano il ruolo dei fattori di rischio trombotico prevalentemente per la trombosi venosa, sebbene questi stessi

siano coinvolti anche nella patogenesi della trombosi arteriosa. L'osservazione di episodi tromboembolici venosi ricorrenti in alcune famiglie, soprattutto in età giovanile in soggetti della medesima famiglia ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di uno stato di trombofilia.

La trombofilia ereditaria viene definita come la tendenza, determinata da fattori genetici predisponenti, alla trombosi venosa, che tipicamente è caratterizzata dalla familiarità, dalla comparsa di eventi in età giovanile (prima dei 40-45 anni), dalla mancanza di altre cause e dalla tendenza a recidivare. Come già detto i pazienti affetti da trombofilia possono, sia pure più raramente, sviluppare anche episodi di trombosi arteriosa.

Dal punto di vista patogenetico la trombosi è il risultato di un'alterazione dell'equilibrio tra forze protrombotiche e antitrombotiche a livello del flusso sanguigno, e di un disturbo dell'interazione tra sangue e parete endoteliale. Già nel 1856, Virchow diede la prima definizione patogenetica della trombosi descrivendo i tre eventi di perturbazione dell'omeostasi vascolare responsabili della formazione del trombo (10):

1. alterazione del flusso sanguigno (stasi o turbolenza);
2. alterazione dello stato di coagulabilità del sangue (ipercoagulabilità);
3. danno della parete vasale (endotelio).

Gli studi di biologia cellulare, di biochimica e di biologia molecolare hanno migliorato e approfondito le nostre conoscenze in merito alla patogenesi degli eventi trombotici, ma hanno confermato i capisaldi della triade di Virchow, che risulta valida a tutt'oggi. Sebbene le trombosi arteriose e quelle

venose abbiano una patogenesi lievemente diversa, in entrambe è comune uno stato di squilibrio nel sistema della coagulazione con una conseguente ipercoagulabilità (11-13).

Il sistema della coagulazione è un complesso enzimatico costituito da una cascata di attivazione di zimogeni inattivi, regolato da cofattori e da inibitori, che giocano un ruolo fondamentale nell'emostasi, indispensabile per il mantenimento dell'integrità vascolare e per un corretto flusso sanguigno all'interno dei vasi. Tradizionalmente si è soliti indicare 2 differenti vie di attivazione della coagulazione:

- la via della fase di contatto o via intrinseca
- la via del complesso fattore VII attivato-fattore tissutale o via estrinseca.

Studi sul meccanismo di attivazione “in vivo” della coagulazione hanno dimostrato che la via del complesso fattore VII attivato-fattore tissutale è la principale via di generazione del fattore X attivato (fattore Xa). Il complesso fattore X attivato-fattore tissutale infatti può attivare sia direttamente che indirettamente il fattore X, mediante proteolisi del fattore IX, saltando i fattori del sistema di contatto. La trombina così generata può attivare a sua volta i fattori XI, IX e VIII, promuovendo un'amplificazione della cascata della coagulazione con la proteolisi del fibrinogeno in fibrina (14-16).

Il sistema della coagulazione è, a sua volta, regolato da un sistema di elementi ad attività anticoagulante, come l'antitrombina III (ATIII), il sistema proteina C-proteina S (PC, PS) e il sistema di inibizione del fattore

tissutale. Il ruolo esercitato da tali proteine è quello di autoregolare l'attivazione della cascata coagulativa per evitare stati di ipercoagulabilità. La perturbazione dell'equilibrio tra questi elementi a funzione anticoagulante e i fattori ad azione procoagulante con uno sbilanciamento a favore degli elementi procoagulanti determina uno stato di ipercoagulabilità.

Negli ultimi anni sono state identificate numerose alterazioni molecolari dell'emostasi responsabili dello stato di trombofilia e della conseguente ipercoagulabilità (Tabella 1). Inoltre, esistono diverse situazioni cliniche (Tabelle 2 e 3) che sono frequentemente associate rispettivamente con un aumentato rischio di trombosi venosa e/o arteriosa, in quanto caratterizzate da stasi venosa e danno endoteliale.

Queste condizioni patogenetiche non si escludono reciprocamente, ma spesso interagiscono nel determinare la ipercoagulabilità e successivamente la trombosi: i pazienti con predisposizione ereditaria sono infatti particolarmente a rischio qualora siano esposti ad una condizione clinica di aumentato rischio tromboembolico (ad esempio gli interventi di chirurgia maggiore e il decorso clinico post-operatorio). La stasi venosa, determinata ad esempio dall'allettamento post-operatorio, è in grado di provocare sofferenza endoteliale da ipossia e quindi di neutralizzare la fisiologica attività anticoagulante dell'endotelio e la sua capacità di mantenere un perfetto equilibrio tra forze protrombotiche ed antitrombotiche. Infatti, la barriera endoteliale integra, impedisce l'attivazione piastrinica e

l'interazione tra piastrine e matrice subendoteliale; essa è in grado di produrre fisiologicamente ossido nitrico e prostaciclina, potenti inibitori dell'attività piastrinica, è in grado di ridurre la trasformazione delle proteine procoagulanti da zimogeni inattivi a forme attive, sbarrando il contatto con la superficie fosfolipidica indispensabile per l'interazione tra i fattori coagulativi, e garantisce inoltre una corretta attivazione delle proteine anticoagulanti come la proteina C (11-13).

All'eccessiva, impropria o inopportuna attivazione del sistema della coagulazione, fa seguito dapprima lo stato di ipercoagulabilità e successivamente la formazione di un trombo cui clinicamente corrisponde un episodio trombotico. Numerosi studi recenti hanno confermato che nei soggetti sani c'è, in vivo, una continua modesta attivazione del sistema emostatico anche in assenza di stimoli trombogenici (17-18). Tuttavia, tale attivazione non riesce ad arrivare alla soglia di manifestazione clinicamente rilevabile grazie all'attività di feed-back negativo esercitata dei cosiddetti anticoagulanti naturali.

Gli inibitori naturali della coagulazione

I tre principali meccanismi anticoagulanti naturali in vivo sono:

- 1) il sistema glicosaminoglicani-antitrombina;
- 2) il sistema Proteina C-trombomodulina-proteina S;
- 3) il sistema di inibizione del fattore tissutale.

- *Sistema glicosaminoglicani-antitrombina*

L'AT III è un inibitore delle serin-proteasi con maggiore affinità per la trombina. E' sintetizzata negli epatociti, ha un P.M. di 58 KD ed è presente nel sangue ad una concentrazione di circa 140 microgrammi/dL. Oltre alla trombina è in grado di inibire altre serin-proteasi del sistema emostatico, quali i fattori XIIa, XIa, IXa e Xa e sembra capace di inibire il complesso fattore VIIa-TF (19-25). Il legame tra AT III e trombina è accelerato circa 1.000 volte dalla presenza di eparina e/o sostanze eparinosimili prodotte in vivo dai mastociti dell'apparato gastroenterico e polmonare e presenti a livello della parete vascolare endoteliale. L'eparina funge da catalizzatore anche per l'attività di altre serin-proteasi inibite dall'AT III, soprattutto del fattore IXa. Analogamente ha l'eparan solfato, un proteoglicano prodotto dalle cellule endoteliali.

- *Il sistema Proteina C-trombomodulina-Proteina S*

La Proteina C è una glicoproteina con P.M. di 69 kD, è vitamina K dipendente, viene prodotta dagli epatociti ed è presente nel plasma ad una concentrazione di 4 microgrammi/dL (26-28). Circola nel sangue sotto forma di zimogeno inattivo. Ha un'azione anticoagulante solo nella sua forma attivata aPC (proteina C attivata): agisce inattivando i fattori Va e VIIIa e quindi in ultima analisi il fattore Xa (29-31). L'enzima responsabile della conversione della Proteina C nella sua forma attivata è la trombina che in vivo, legandosi alla trombomodulina presente sulla superficie endoteliale, accelera

ben 10.000 volte la reazione, facilitando l'attivazione della proteina C. In sintesi, la trombina prodotta dall'attivazione del sistema della coagulazione esercita anche un'azione di controllo retrogrado su un'eccessiva attivazione del sistema attivando un anticoagulante naturale (32).

Cofattore di questa serie di reazioni è la proteina S: anch'essa è una glicoproteina, vitamina K dipendente, con P.M. 69 kD. Viene prodotta dagli epatociti e dalle cellule endoteliali, è presente nel plasma ad una concentrazione di 23 microgrammi/dL, in due forme: una quota libera attiva e una quota inattiva legata a un altro regolatore del sistema, la C4 binding protein. Anche la proteina S è in grado, legandosi con la proteina C attivata, di accelerare il clivaggio del fattore V e del fattore VIII (33-35).

- *L'inibitore della via del Fattore Tissutale (TFPI)*

Un sistema anticoagulante naturale con un potenziale ruolo nella regolazione della trombogenesi in vivo è il TFPI (tissue factor pathway inhibitor ossia il sistema di inibizione del Fattore Tissutale).

Il TFPI è una proteina composta da 276 aminoacidi, sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai megacariociti. Ha un P.M. di 40 KD ed è presente nel plasma sotto quattro forme ad una concentrazione totale di 100 ng/mL (36-38).

- il 75% del TFPI è legato alla superficie endoteliale ed è rilasciato in circolo in seguito all'infusione di eparina (frazione "heparin releasable");
- il 20% circola legato alle proteine plasmatiche;

- circa il 3% circola in forma libera;
- il restante 2 % è contenuto nelle piastrine e rilasciato in seguito a stimolazione da parte di agonisti come la trombina.

Il TFPI inibisce sia l'interazione tra Fattore VII e TF sia l'attivazione del fattore X da parte del prodotto di questa interazione: pertanto, il TFPI esercita una funzione cruciale nel mantenere l'endotelio vascolare in uno stato di resistenza alla trombosi (39).

A differenza degli altri anticoagulanti naturali, non è stato finora descritto uno stato di carenza ereditaria di TFPI associato con un aumentato rischio tromboembolico.

Carenze degli anticoagulanti naturali e trombosi.

- *Carenza di antitrombina III*

La potente azione anticoagulante dell'AT III giustifica l'incidenza di trombosi del sistema venoso nei soggetti con carenza congenita o acquisita di AT III, descritta per la prima volta nel 1970: questo difetto è trasmesso con carattere autosomico dominante e nella forma eterozigote ha una prevalenza variabile dall'1 al 3% tra i soggetti con trombosi venose idiopatiche e dello 0.3% nella popolazione generale. Nel difetto di tipo I (deficit antigenico e funzionale) si stima che approssimativamente la metà dei membri di una famiglia affetta vada incontro ad un episodio tromboembolico venoso prima dei 25 anni (40-41). Esistono anche forme acquisite di deficit di AT III,

secondarie a sindrome nefrosica (42), a grave insufficienza epatica, a coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (43) o ad uso di estroprogestinici (44-45).

- *Carenza di proteina C e proteina S*

I deficit congeniti di proteina C e proteina S, scoperti rispettivamente nel 1981 e nel 1984, sono trasmessi con modalità autosomica dominante e possono essere quantitativi e qualitativi (tipo I) oppure solo quantitativi (tipo II). Si stima che la carenza di proteina C si aggiri sullo 0.5 % nella popolazione generale e dal 3 al 5% in coorti di pazienti con trombosi. I soggetti eterozigoti hanno una probabilità del 50% di sviluppare un evento tromboembolico venoso entro i 45 anni, con un rischio relativo per un primo episodio stimato tra 8 e 11 (46-48). La carenza di proteina S in coorti di pazienti con trombosi si aggira intorno al 2% circa, ma non ne conosciamo la prevalenza nella popolazione generale. Il rischio relativo per episodi tromboembolici venosi è stimato essere approssimativamente di 10 (49-50).

Esistono anche carenze degli anticoagulanti naturali di tipo acquisito: deficit di proteina C di grado variabile si associano a epatopatia con grave difetto di sintesi, a sindrome da coagulazione intravascolare disseminata (DIC), a sindrome da distress respiratorio dell'adulto o a stato postoperatorio (51-53).

Deficit di Proteina S può essere riscontrato in pazienti in terapia estroprogestinica (pillola anticoncezionale), gravidanza, o DIC (54-55). Stati

di carenza acquisita di Proteina S possono essere correlati ad aumentati livelli plasmatici di C4 binding protein, una proteina della fase acuta dell'inflammazione (56).

Altri stati trombofilici congeniti

La Resistenza alla proteina C attivata e il fattore V Leiden

Nell'ambito degli studi sulle alterazioni del sistema emostatico correlate alla trombofilia la scoperta più significativa è stata l'identificazione di un difetto nella risposta anticoagulante della proteina C attivata (Resistenza alla proteina C attivata: APC-R), descritto per la prima volta da Dahlback nel 1993 (57-58). La proteina C è una serin-proteasi vitamina K dipendente attivata dal complesso trombina-trombomodulina sulla superficie delle cellule endoteliali. Una volta attivato, l'enzima degrada i fattori Va e VIIIa, esplicando così la sua attività anticoagulante. L'APC-R è la causa di circa il 21% delle trombosi venose profonde nei soggetti con età inferiore ai 70 aa, e di circa il 50 % delle trombosi venose familiari.

Il difetto molecolare responsabile di oltre il 95% dei casi di APC-R (59), è una mutazione puntiforme a livello del nucleotide 1691 dell'esone 10 del gene che codifica per il fattore V che determina la sostituzione in posizione 506 di una arginina con una glutammina nel sito di clivaggio del fattore V ad opera della proteina C attivata. Il fattore V così alterato (fattore V mutante o Leiden) non può essere degradato dalla proteina C attivata stessa,

per cui conserva la sua attività procoagulante e determina uno stato di ipercoagulabilità.

Il Fattore V mutante (fattore V Arg506Gln) è la più comune tra le cause, congenite o acquisite, di trombofilia nella popolazione generale, dove si calcola abbia una prevalenza variabile a seconda delle popolazioni dal 2 al 5% (60). Esso è associato ad un aumentato rischio trombotico ed è stato trovato in circa il 50% delle famiglie selezionate con trombofilia e in circa il 20% dei pazienti consecutivi con trombosi. Nella sua forma eterozigote aumenta il rischio dei portatori di sviluppare una trombosi di circa 7 volte. Il rischio di trombosi nei soggetti omozigoti è invece aumentato di circa 80 volte e la maggior parte dei portatori sviluppa almeno un episodio di trombosi durante la propria vita. L'espressione del fenotipo è altamente variabile e in genere le manifestazioni cliniche non sono così gravi come nei deficit degli anticoagulanti naturali (proteina C, proteina S ed antitrombina III) (61).

Tuttavia, è chiaro che la presenza di fattori di rischio ambientali come un intervento chirurgico, la gravidanza e soprattutto la terapia estroprogestinica aumentano il rischio di sviluppare una trombosi nei pazienti con APC-R (62).

Controverso è invece a tutt'oggi il ruolo del fattore V mutante nella patogenesi delle trombosi arteriose (63). Alcuni studi recentemente pubblicati hanno dimostrato che non c'è un incremento significativo delle trombosi arteriose in questi pazienti. Al contrario, un recente studio sui pazienti eterozigoti ha documentato un aumento del rischio di eventi ischemici cerebrali (64) in questi soggetti. Inoltre, il fattore V Leiden è considerato un

fattore di rischio per stroke nei bambini, negli adolescenti e persino nei soggetti con emofilia.

- *Polimorfismo genetico della Protrombina A20210G.*

Un'altra causa di ipercoagulabilità secondaria è la mutazione del gene che codifica per la protrombina (fattore II), caratterizzata dalla sostituzione di una guanina con un'adenina nella posizione 20210 della regione 3' del gene che codifica per la protrombina, scoperta nel 1996 dallo stesso gruppo olandese che aveva identificato nel fattore V mutato la causa della resistenza alla proteina C attivata (65-66). Tale polimorfismo è stato trovato in eterozigosi nel 18% dei pazienti selezionati con una storia personale o familiare per trombosi venose, nel 6.2 % dei pazienti con un primo episodio di trombosi venosa profonda non selezionati e nel 2.3 % della popolazione caucasica sana. Confrontati con i soggetti non affetti, i soggetti eterozigoti per la mutazione hanno un rischio di trombosi circa 3 volte maggiore.

E' da notare che la sostituzione nucleotidica non comporta alcuna sostituzione aminoacidica nella molecola della protrombina, perchè è localizzata nella zona non codificante del gene. Il meccanismo responsabile è stato chiarito solo in parte, in quanto tale polimorfismo genetico si associa ad un'aumentata attività del promotore che frequentemente determina livelli plasmatici elevati di protrombina, che a loro volta potrebbero aumentare i livelli di trombina. Anche la mutazione della protrombina ha una prevalenza nella popolazione generale alta e tipica di un poliformismo (0.3-4%) con un

gradiente di distribuzione geografica che appare inverso a quello del fattore V mutato (più frequente nel Sud Europa che nel Nord).

Nonostante l'eterozigosi per la variante A20210G sia stata associata a numerosi e diversi tipi di patologia trombotica, una recente revisione dei soli 60 casi descritti in letteratura omozigoti per la variante riporta che soltanto una metà di essi presentavano manifestazioni trombotiche clinicamente rilevanti, laddove quasi la metà degli altri non mostravano all'anamnesi alcuna alterazione clinicamente significativa (65-66).

Iperomocisteinemia e patologia trombotica

Iperomocisteinemia

L'omocisteina è un aminoacido solforato presente nel plasma dell'individuo normale in concentrazioni variabili fra 5 e 15 micromol/L. Prodotto della metionina attraverso la rimozione di un gruppo metilico, può essere metabolizzato a cisteina mediante un processo di transulfurazione o di nuovo a metionina attraverso un processo di rimetilazione. In queste trasformazioni sono coinvolti tre enzimi: la metilentetrafoloreduttasi (MTHFR), enzima chiave nel ciclo dell'acido folico; la metionina sintetasi, il cui coenzima è la vitamina B12; la cistationina-beta-sintetasi (CBS), che utilizza come cofattore enzimatico la vitamina B6. La carenza o anomalità funzionale di questi enzimi e/o la carenza dei loro cofattori vitaminici

determinano un difettoso metabolismo dell'aminoacido e quindi il suo accumulo nel plasma in elevate concentrazioni (67).

Partendo dall'osservazione che l'iperomocisteinemia grave (omocistinuria), determinata da carenze omozigoti di cistationina- β -sintetasi e della reduttasi, è associata con eventi tromboembolici arterovenosi, l'iperomocisteinemia moderata è stata prima ipotizzata e poi dimostrata essere fattore di rischio per trombosi arteriose e venose.

La prevalenza dell'iperomocisteinemia moderata nella popolazione generale è stata stimata essere intorno al 5%, mentre la sua prevalenza nei pazienti giovani con tromboembolismo venoso sembra essere intorno al 15% (68).

Nell'iperomocisteinemia moderata l'attività enzimatica di MTHFR o di CBS può essere ridotta al 50%: la prevalenza di questi difetti enzimatici nella popolazione generale è di circa 0.4-1.5%.

Esiste inoltre la possibilità della presenza di una variante termolabile della MTHFR legata alla presenza del polimorfismo genetico C677T. Non in tutti i soggetti portatori della mutazione si riscontrano valori elevati di omocisteinemia: ciò fa supporre che la loro espressione fenotipica possa essere influenzata da altri fattori, per esempio i livelli sierici di acido folico.

L'iperomocisteinemia acquisita, quindi, può essere causata da deficit di cofattori essenziali per il metabolismo della metionina:

- deficit di folati
- deficit di cobalamina (vitamina B12)

- deficit di piridossina (vitamina B6)

e da

- insufficienza renale cronica
- dall'utilizzo di alcuni farmaci

Alcuni farmaci interferiscono con il metabolismo dei folati come il methotrexate e gli anticonvulsivanti, della cobalamina come l'ossido nitrico e della vitamina B6 come la teofillina: essi possono causare iperomocisteinemia moderata. Gli estrogeni, il tamoxifene, la penicillamina e l'acetilcisteina riducono invece i livelli plasmatici di omocisteina.

Iperomocisteinemia e trombosi

I meccanismi attraverso cui gli aumentati livelli plasmatici di omocisteina determinano uno stato trombofilico con manifestazioni trombotiche venose e arteriose non sono ancora ben chiari. Studi sperimentali in vivo hanno evidenziato una eccessiva attivazione dei meccanismi procoagulanti della cellula endoteliale, l'inibizione del meccanismo anticoagulante della proteina C attivata e della trombomodulina, l'inibizione di meccanismi di vasodilatazione e aggregazione piastrinica come quelli della prostaciclina e del nitrossido (68).

Fattori acquisiti di rischio trombotico

Essendo la patologia trombotica una patologia multifattoriale, oltre ai fattori genetici predisponenti sopraesposti, riconosce anche ulteriori fattori di

rischio acquisiti in presenza dei quali gli eventi trombotici sono più frequenti. I fattori di rischio trombotico acquisiti sono divisibili ugualmente in fattori di rischio per le trombosi arteriose e per le trombosi venose.

I fattori di rischio acquisiti per le trombosi arteriose sono stati identificati e confermati come tali alla fine degli anni '50 grazie ai dati offerti da un vasto studio epidemiologico quale quello di Framingham (2-4). In seguito a tale studio sono stati riconosciuti quali fattori di rischio indipendente per le patologie trombotiche dei distretti arteriosi (in particolare sindromi coronariche acute e stroke ischemico) l'età avanzata, il fumo di sigaretta, il diabete mellito (sia insulino-dipendente sia iperinsulinemico), l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia, l'obesità. Tali fattori di rischio sono stati validati anche da studi più recenti e numerose strategie di prevenzione relative al trattamento delle patologie predisponenti alla patologia trombotica arteriosa sono ancora oggetto di studi e ricerche su ampia scala.

I fattori di rischio acquisiti per le trombosi venose sono stati identificati da diversi e numerosi studi sia in popolazioni di pazienti ospedalizzati sia di pazienti non-ospedalizzati afferenti ad ambulatori specialistici. Anche in questo caso l'età avanzata è stata riconosciuta quale fattore di rischio trombotico (69). Successivi studi hanno evidenziato l'associazione tra tromboembolismo venoso e patologia chirurgica in particolare con il prolungato allettamento dei pazienti sottoposti recentemente a chirurgia maggiore (70). Studi successivi hanno anche sottolineato come alcuni tipi di chirurgia siano maggiormente esposte ai rischi tromboembolici quali la

chirurgia addominale e la chirurgia ortopedica (70). Nei successivi anni anche l'allettamento prolungato per patologie non chirurgiche è stato riconosciuto come fattore di rischio indipendente per la trombosi venosa profonda e la tromboembolia polmonare (71). Gli studi più recenti degli ultimi 20 anni hanno invece collegato numerose forme di tromboembolismo venoso anche a patologie internistiche in particolare quelle determinanti allettamenti prolungati e/o ripetuti ricoveri in ambiente ospedaliero quali sindromi coronariche acute, scompenso cardiaco, broncopneumopatie croniche ostruttive, patologie neurologiche acute/subacute, patologie infiammatorie croniche, stati settici e patologie oncologiche (72-73). Queste ultime inoltre sono state riconosciute come cause di tromboembolie venose durante tutta la loro storia naturale (71, 74) in quanto tanto l'approccio chirurgico che quello non-chirurgico sono causa di ipercoagulabilità. Fattori di rischio non chirurgico causa di trombofilia sono infatti sia la chemioterapia che la radioterapia, ma anche la somministrazione di fattori di crescita midollare somministrati in caso di citopenie midollari secondarie a trattamenti radio-chemioterapici e non ultime le somministrazioni di ormoni come prevenzione secondarie delle recidive oncologiche ormono-sensibili (71). Ulteriori fattori di rischio per le trombosi venose sono gli ormoni somministrati a scopo contraccettivo o sostitutivo come evidenziato da diversi studi internazionali (75).

SCOPI DEL PROGETTO DI RICERCA: per alcune patologie trombotiche non è ben chiaro il ruolo predisponente dei fattori protrombotici congeniti

Sino a pochi anni orsono, si era soliti identificare i comuni fattori di rischio della patologia coronarica con i fattori di rischio di aterosclerosi: ipertensione arteriosa, diabete mellito, dislipidemia, fumo di sigaretta, obesità; l'identificazione di tali fattori di rischio derivava da una serie di studi epidemiologici, capostipite dei quali era lo studio Framingham, iniziato nel 1947 (2-4). Particolare rilevanza negli anni è stata attribuita alla presenza di altri familiari di primo grado affetti da patologia coronarica suscitando il successivo interesse per la ricerca di possibili stati di ipercoagulabilità presenti in tali soggetti e/o famiglie.

Il primo aspetto su cui si è sviluppato il lavoro di tesi riguarda i rapporti tra fattori protrombotici ereditari e malattia coronarica acuta in particolare ad esordio giovanile. L'ipercoagulabilità nelle patologie coronariche è stata infatti oggetto di numerosi studi negli ultimi decenni. In particolare è stata evidenziata in soggetti affetti da sindrome coronarica acuta la presenza di valori elevati dei marcatori di ipercoagulabilità, quali il fibrinopeptide A (FPA), il frammento protrombinico 1+2 (F_{1+2}) e i complessi trombina-antitrombina (TAT) (76-80). Elevati livelli di FPA sono stati poi correlati a una più frequente incidenza di patologia coronarica al momento dell'ingresso in ospedale. Ugualmente studiati in tali condizioni allo scopo di identificare l'ipercoagulabilità in caso di sospetta sindrome coronarica acuta

sono i prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina quali FDP e d-dimero (81-82). Livelli elevati di tali marcatori di ipercoagulabilità, tuttavia, possono essere spesso presenti in maniera subclinica anche in pazienti portatori di predisposizione genetica alla trombofilia per la presenza di polimorfismi genetici quali quello del fattore V Leiden, della variante G20210A della protrombina, del polimorfismo C677T della metilene-tetra-idro-folato reduttasi (MTHFR) (83). Tuttavia, studi sull'associazione tra predisposizione genetica e l'insorgenza precoce di sindromi coronariche acute (i.e. < 50 aa) sono carenti in letteratura e i risultati disponibili in tali studi sembrano essere contrastanti.

Altro aspetto del nostro studio, ha riguardato il ruolo della variante G20210A del fattore coagulativo II nello sviluppo del fenotipo trombotico. La correlazione tra il polimorfismo A20210G della protrombina e la cardiopatia ischemica, infatti, ha dato esiti contrastanti. Un'associazione tra il polimorfismo genetico A20210G della protrombina e la cardiopatia ischemica è stata infatti ricercata da diversi Autori e Rosendaal et al. nel 1997, Doggen et al. nel 1998, Arruda et al. nel 1998 (84-86), hanno riportato nelle loro osservazioni un'associazione della variante A20210G della protrombina con l'infarto miocardico, mentre Ferraresi et al. nel 1997 e Croft et al. nel 1999 (87-88) non hanno riscontrato alcun tipo di associazione tra frequenza, età di insorgenza o prevalenza del sesso femminile sul sesso maschile dell'infarto miocardico con tale variante genetica. Allo stesso modo, dati contrastanti tra la presenza della mutazione Leiden del fattore

coagulativo V e cardiopatia ischemica sono presenti in letteratura: uno studio di Donmez et al. (89) non ha riscontrato associazione tra infarto miocardico e FVL, mentre uno studio americano di Middenkorf et al. (90) ha evidenziato una netta associazione del FVL con la patologia ischemica coronarica; entrambi gli studi sono stati pubblicati nel 2004.

Il nostro studio si è inoltre rivolto a valutare i rapporti tra fattori protrombotici ereditari, acquisiti e malattie tromboemboliche venose. La patologia tromboembolica venosa, infatti, è una patologia multifattoriale che coinvolge fattori di rischio congeniti e acquisiti. Si è soliti identificare sotto l'acronimo di tromboembolismo venoso (TEV) diversi quadri di patologia trombotica venosa quali le trombosi venose profonde degli superiori o inferiori, le trombosi venose profonde di organi o altri distretti venosi, le embolie polmonari. Numerosi studi hanno evidenziato una stretta associazione tra lo sviluppo di TEV in soggetti portatori di trombofilia genetica e/o acquisita (6). Sono stati inoltre sottolineati altri aspetti rilevanti nello sviluppo del TEV in soggetti portatori di trombofilie genetiche e cioè un precoce esordio di patologia, spesso associato anche alla presenza di altri fattori di rischio, un'elevata tendenza alla recidiva di TEV da parte degli stessi soggetti e una forte aggregazione familiare al TEV da parte dei parenti di primo livello spesso portatori anch'essi di trombofilia (91).

Risultati non univoci sono descritti sulle associazioni tra trombofilia genetica e trombosi venose dell'arto superiore e possono dipendere dal fatto che tale patologia è stata ritenuta rara sino a pochi anni orsono. Tuttavia una

migliore evoluzione delle conoscenze cliniche e un migliore approccio diagnostico (sviluppo e affidabilità delle procedure di diagnostica strumentale quale ecocolorDoppler venoso e/o esami contrastografici quali flebografie, angioTC e/o angio RMN) ha consentito un aumento delle diagnosi di tale patologia (92). Ancora dibattuto è però il ruolo dei fattori protrombotici genetici trombofilia genetica nello sviluppo della trombosi venosa profonda dell'arto superiore data l'esiguità delle casistiche riportate negli studi disponibili in letteratura.

Dati degli anni '80 evidenziavano infatti uno scarso ruolo dei fattori genetici nello sviluppo delle trombosi venose profonde degli arti superiori (93-94), mentre studi recenti su casistiche più ampie hanno dimostrato non solo un ruolo predisponente dei fattori protrombotici ereditari nello sviluppo delle trombosi venose profonde dell'arto superiore e anche una loro possibile correlazione con un' aumentata incidenza di recidive tromboemboliche nei pazienti portatori.

Altro campo di interesse del nostro studio è stato lo pseudotumor cerebri, e la ricerca di eventuali fattori predisponenti tale patologia. Lo pseudotumor cerebri è una sindrome da ipertensione endocranica ad etiologia ignota senza presenza di alterazioni liquorali, segni di malformazioni cerebrali e/o segni di demielinizzazione. Un esordio clinico relativamente precoce, di solito soggetti adulti di età inferiore ai 50 anni, e una maggiore incidenza nelle donne hanno suscitato notevole interesse per la ricerca delle cause etiologiche (95). L'obesità spesso presente nei soggetti affetti da

pseudotumor cerebri ne ha suggerito una ipotetica associazione con alterazioni ormonali ma dati certi in tal senso sono carenti. Tuttavia un'aumentata incidenza di fumatori è stata riscontrata nei soggetti affetti da tale patologia così come un'aumentata frequenza di familiari affetti da patologie vascolari ha permesso di orientare le ricerche sui possibili fattori di rischio vascolare genetici e/o acquisiti. E' stato, infatti, ipotizzato un meccanismo di patogenesi microvascolare con microtrombosi dei vasi venosi di piccolo calibro intracerebrali che ostacolerebbe lo scarico del liquor con conseguente aumento della pressione liquorale intracranica (95-96). Interessando soggetti di età adulta ma non anziani prevalentemente di sesso femminile sono state postulate diverse eziologie e un'associazione causale è stata trovata con l'obesità, con l'ovaio policistico e con il fumo di sigaretta (95-97). Essendo frequentemente tali condizioni patologiche associate a ipercoagulabilità, sono stati indagati anche alcuni fattori protrombotici e pare sia presente una correlazione tra la malattia e la sindrome da anticorpi antifosfolipidi, gli aumenti plasmatici di fattore VIII, l'ipofibrinolisi sia per aumento dei livelli plasmatici di PAI-1 sia per la presenza del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 (95-99). L'associazione con la trombofilia genetica per carenza di inibitori fisiologici della coagulazione (proteina C, proteina S, AT III) o per la presenza di varianti genetiche del fattore V Leiden è invece sporadica e segnalata solo da casi clinici isolati. (95-99).

Abbiamo inoltre iniziato a valutare nel nostro studio i rapporti tra fattori protrombotici ereditari e poliabortività. La poliabortività si può

identificare come una delle principali cause di infertilità di coppia (100). La trombofilia può influenzare non solo la sterilità di coppia, ma anche in caso di gravidanza ottenuta, l'outcome della gravidanza stessa, in particolare se riferita a complicazioni quali l'insufficienza placentare, la preeclampsia, il ritardo di crescita intrauterino, abruption placenta, morte fetale inspiegabile, abortività tardiva.

Alcuni polimorfismi genetici, quali la variante Leiden del fattore V e la variante G20210A della protrombina, sembrano esercitare già un ruolo preminente nella predisposizione alla poliabortività (101-103). Altre condizioni geneticamente correlate alla ipercoagulabilità, che possono essere associate a poliabortività, sono le carenze di inibitori fisiologici dell'emostasi quali proteina C, proteina S, antitrombina III (AT III) (104).

Inoltre, nei disordini dell'emostasi che possono potenzialmente determinare abortività va inclusa l'iperomocisteinemia che può avere ugualmente cause congenite e/o acquisite. Tra le cause acquisite di iperomocisteinemia riconosciamo una dieta povera di folati, condizioni patologiche (ipotiroidismo, alterazioni del ricambio idrosalino, ridotta attività fisica, condizioni iatrogene-farmacologiche).

Tuttavia, i dati sull'associazione tra iperomocisteinemia e poliabortività sono ancora contrastanti in quanto i livelli di omocisteinemia sembrano decrescere durante la gravidanza in parte per una dieta maggiormente ricca in frutta e verdura, in parte per la somministrazione di

basse dosi di acido folico per la prevenzione dei difetti del tubo neurale durante la gestazione (105-108).

Ulteriore campo d'interesse per lo studio di tesi riguardo la predisposizione alla tromboangiite obliterante. La tromboangiite obliterante o morbo di Buerger è una patologia ad eziologia ignota che colpisce soggetti giovani e determina ischemie degli arti ed è strettamente correlata al fumo di sigaretta (109). I soggetti affetti sono usualmente giovani maschi, forti fumatori. La patologia si manifesta con occlusioni trombotiche acute che interessano usualmente distretti arteriosi distali degli arti inferiori ma talvolta anche superiori sino all'ischemia d'arto che può richiedere anche amputazioni giovanili. La diagnostica differenziale si pone soprattutto con la patologia aterosclerotica dei medesimi distretti che riconosce tuttavia esordio in età decisamente adulta, occlusioni gradualmente del distretto arterioso e presenza dei comuni fattori di rischio per l'aterosclerosi oltre al fumo di sigaretta (ad esempio familiarità per patologie aterotrombotiche, obesità, diabete mellito, dislipidemia, ipertensione arteriosa). Diversi tentativi di associare la tromboangiite obliterante con alterazioni dell'emostasi sono stati effettuati negli ultimi anni ma soltanto descrizioni di singoli casi clinici atipici hanno consentito di identificare talvolta soggetti portatori di deficit di inibitori naturali della coagulazione o altri tipi di trombofilie. Allo stesso modo, diversi casi clinici descrivono la presenza di iperomocisteinemia con livelli medio-alti in pazienti affetti da morbo di Buerger (109-111), mentre studi su casistiche più estese non hanno evidenziato alcun tipo di associazione tra tale patologia e

la presenza del polimorfismo C677T della MTHFR (112-114). Il ruolo dell'iperomocisteinemia in tale patologia, tuttavia, è infatti ancora oggetto di numerose investigazioni in quanto potrebbe concorrere quale determinante tossico dei distretti vascolari ed essere anche effetto dei danni endoteliali vascolari.

Infine, ci siamo soffermati sullo studio e l'osservazione clinica prolungata di alcuni pazienti portatori di genotipi rari tra cui alcuni soggetti omozigoti per la variante G20210A della protrombina.

Lo studio dei fattori genetici protrombotici viene usualmente effettuato per pazienti che manifestano eventi trombotici in giovane età e con tendenza a recidive spesso non associati a presenza di ulteriori fattori di rischio trombotico. Gli studi epidemiologici degli ultimi decenni hanno successivamente evidenziato come in diverse regioni europee la frequenza di tali polimorfismi possa essere rilevante. I polimorfismi di geni predisponenti alla trombofilia più studiati sono il fattore V Leiden e la protrombina A20210G che possono raggiungere frequenze ragguardevoli in casistiche selezionate di pazienti affetti da patologie trombotiche (115-116). I dati disponibili hanno tuttavia evidenziato come la stragrande maggioranza dei soggetti affetti da patologie trombotiche sia portatore di tali polimorfismi allo stato eterozigote. Viceversa, i dati relativi alle manifestazioni fenotipiche di pazienti portatori di tali polimorfismi allo stato omozigote, in particolare se si considera il polimorfismo A20210G della protrombina, sono pochi e spesso limitati a singoli casi clinici.

In conclusione, quindi, gli scopi dello studio di tesi hanno riguardato la ricerca di fattori protrombotici ereditari ed acquisiti in popolazioni selezionate di pazienti affetti da:

- sindromi coronariche acute ad esordio giovanile e ad esordio non giovanile
- trombosi venose profonde degli arti superiori
- poliabortività
- pseudotumor cerebri
- tromboangioite obliterante o morbo di Buerger

E' stata inoltre studiata l'espressione fenotipica di 6 pazienti omozigoti per la variante G20210A della protrombina, proponendo un nuovo modello secondo cui la malattia epatica cronica potrebbe agire da fattore protettivo verso lo sviluppo di malattie trombotiche.

PAZIENTI E METODI

Metodi

Tutti i soggetti selezionati per lo studio sono stati sottoposti a prelievo venoso in provetta da 7 mL contenente EDTA come anticoagulante. Il DNA è stato quindi estratto col kit "NUCLEON BACC2" (Amershan, Germany). e sottoposto a lettura spettrofotometrica a 260 nm al fine di valutarne la concentrazione. I campioni di DNA così estratti sono stati sottoposti ad amplificazione mediante la metodica PCR real-time. Tale metodica prevede l'impiego del termociclatore LightCycler® della Roche Diagnostics e dei kit (prodotti dalla ROCHE Diagnostics/TibMol Biol su nostro protocollo) contenenti specifiche coppie di primers per le regioni dei geni dove sono localizzate le mutazioni da analizzare. L'interpretazione del risultato è avvenuta mediante analisi della curva di dissociazione ("melting") al termine dei cicli di amplificazione (Figure 1 e 2). Le curve di dissociazione del LightCycler® permettono il rilevamento accurato di "mismatch" di singole basi.

Le varianti geniche analizzate nei nostri pazienti sono state: la variante Leiden del fattore V (FVL), la variante HR2 del fattore V (FV HR2), la variante G20210A della protrombina (PTHRA20210G), le varianti C677T e A1298C della metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR C677T) metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR A1298C), la variante 4G\5G dell'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1 4G\5G), la

variante Val34Leu del fattore XIII (F XIII V34L), la variante A455G del beta fibrinogeno, la variante inserzione\delezione dell'enzima di conversione dell'angiotensinogeno (ACE ID).

Pazienti

Sono stati selezionati per il progetto di ricerca 445 pazienti afferenti al laboratorio di diagnostica molecolare del Ceinge-Biotecnologie avanzate per la ricerca di polimorfismi genetici determinanti trombofilia perché affetti da sindromi coronariche ad esordio giovanile, da trombosi venose profonde degli arti superiori, poliabortività, pseudotumor cerebri, tromboangiite obliterante o morbo di Buerger. La maggior parte di questi pazienti è stata valutata clinicamente presso l'Ospedale Fatebenefratelli di Napoli dove è stata svolta in parte l'attività di tesi; i rimanenti, previo consenso informato raccolto da ciascun paziente, i dati clinici, di laboratorio, strumentali e di follow up sono stati raccolti da altre strutture cliniche con le quali abbiamo avuto collaborazione come le divisioni di Medicina Interna e di Patologia Generale della Seconda Università di Napoli, il Centro Trombosi dell'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano (MI), la divisione di Medicina Interna dell'Ospedale Tria y Puyol di Barcellona e presso altre strutture della Regione

Pazienti con sindromi coronariche ad esordio giovanile

Sono stati selezionati 232 pazienti affetti da sindrome coronarica acuta (132 ad esordio giovanile, 100 con esordio non giovanile) diagnosticata

secondo le attuali linee guida dell'ACCP\AHA (117-118) in accordo con i seguenti criteri,

- √ elettrocardiografia: elevazione persistente del tratto ST superiore a 1 mm o sottolivellamento persistente o transitorio del tratto ST, inversione delle onde T, comparsa di un blocco di branca sinistra di nuova insorgenza;
- √ clinica: dolore toracico di notevole intensità con irradiazione verso spalla, braccio sn, mandibola, epigastrio associato eventualmente a intensa sudorazione, pallore, stato d'ansia;
- √ laboratorio: incremento sierico di troponina T e CK MB massa.

Tutti i pazienti affetti da qualsiasi forma di sindrome coronarica acuta (infarto miocardico con sopralivellamento del tratto ST (STEMI), infarto miocardico con sottolivellamento del tratto ST (NSTEMI), angina instabile], sono stati suddivisi in base all'età anagrafica in pazienti con esordio giovanile (< 50 anni) e pazienti ad esordio non giovanile (> 50 anni).

Pazienti affetti da trombosi venose profonde dell'arto superiore

Sono stati selezionati 181 pazienti affetti da trombosi venosa profonda degli arti superiori diagnosticata tramite metodi oggettivi\strumentali (e.g. ecocolorDoppler, angio-TC, angio-RMN) e ne sono stati ulteriormente classificati i vari fattori di rischio.

Pazienti affette da poliabortività

Sono state selezionate 100 pazienti affette da poliabortività non spiegabile dalle comuni cause di abortività ricorrente secondo i seguenti criteri di selezione:

- ≥ 2 aborti nel I trimestre di gestazione;
- ≥ 2 aborti nel II trimestre di gestazione;
- almeno 1 morte endouterina fetale (MEF) nel III trimestre di gestazione.

Pazienti affetti da pseudotumor cerebri

Sono stati selezionati 17 pazienti affetti da pseudotumor cerebri diagnosticato secondo i criteri di diagnosi internazionali proposti da Dandy nel 1937 (119) e modificati da Smith nel 1985 (120):

- segni e sintomi di ipertensione endocranica con valori pressori del liquor > 25 mmHg;
- assenza di segni neuropatologici ad eccezione del deficit del VI paio di nervi cranici;
- normale composizione e aspetto del liquor;
- assenza di masse intracraniche con aspetto regolare o ridotto in ampiezza dei ventricoli cerebrali;

Pazienti affetti da tromboangioite obliterante (morbo di Buerger)

Sono stati selezionati 9 pazienti affetti da tromboangiite obliterante o morbo di Buerger, diagnosticata secondo i criteri di Shionoya (121).

- esordio di malattia anteriore ai 50 anni;
- assenza di altri fattori di rischio aterosclerotico ad eccezione del fumo;
- interessamento dei distretti vascolari degli arti superiori;
- tromboflebiti migranti;
- trombosi arteriose del distretto sottopopliteo.

Pazienti con omozigosi per la variante A20210G della protrombina

Sono stati selezionati 6 soggetti portatori della variante A20210G della protrombina riferiti al nostro centro per il rilievo clinico-anamnestico di patologia trombotica o per la presenza di un familiare di primo grado portatore della variante suddetta allo stato eterozigote.

Gruppi controllo

Sono stati selezionati soggetti paragonabili per età, sesso e caratteristiche antropometriche non presentanti patologie trombotiche in atto o recenti come gruppo controllo. I campioni di popolazione del gruppo controllo sono stati adeguati di volta in volta a seconda della ricerca clinica in corso.

RISULTATI

Sindromi coronariche ad esordio giovanile e ad esordio non giovanile

Lo studio è stato effettuato su 232 pazienti affetti da sindrome coronarica acuta di cui 132 ad esordio giovanile e 100 ad esordio non giovanile, diagnosticata secondo le attuali linee guida dell'ACCP\AHA (117-118); in confronto, sono stati studiati 384 soggetti della popolazione generale senza rilievo anamnestico di patologia coronarica. Lo studio è stato teso a definire se alcuni fattori protrombotici congeniti avessero maggior frequenza nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile rispetto alla forma ad esordio tardivo e rispetto alla popolazione generale. I principali risultati dello studio sono:

- 1) la variante HR2 del fattore V è presente con frequenza significativamente più elevata nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile rispetto alle sindromi coronariche ad esordio non giovanile ($p < 0.01$, Tabella 4) e rispetto alla popolazione generale di controllo ($p = 0.05$); Tabella 5
- 2) la variante 4G\5G del PAI-1 è presente con frequenza significativamente più elevata nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile rispetto ai pazienti con forma non giovanile (Tabella 4); la frequenza di tale variante non è statisticamente diversa nel sottogruppo di pazienti con infarti giovanili rispetto ai controlli (Tabella 5);

3) la variante genica C677T della MTHFR e la variante V34L del fattore XIII sono significativamente più frequenti nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio non giovanile rispetto ai controlli (Tabella 6).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra le frequenze delle varianti geniche del fattore V Leiden, della protrombina A20210G, della glicoproteina HPA-1b, del beta-fibrinogeno 455 A-G, nei gruppi analizzati (sindromi coronariche acute ad esordio giovanile, sindromi coronariche acute ad esordio non giovanile, gruppo controllo).

Pazienti affetti da trombosi venose profonde dell'arto superiore

Dallo studio multicentrico internazionale RIETE sul tromboembolismo venoso che ha arruolato sino al 2008 circa 21000 pazienti affetti da tromboembolismo venoso in Europa, abbiamo selezionato 181 pazienti affetti da trombosi venosa profonda (TVP) dell'arto superiore diagnosticata tramite procedure strumentali (e.g. ecocolorDoppler, angio-TC, angio-RMN). I pazienti selezionati sono stati analizzati per valutarne gli eventuali fattori di rischio (Tabelle 7 e 8). 82/181 presentavano fattori di rischio protrombotico. In particolare, 44/82 pazienti (52.8%) presentavano fattori protrombotici di tipo ereditario (iperomocisteinemia: 24.4%; fattore V Leiden: 12.2%; deficit di Proteina C: 2.4%; deficit di proteina S: 3.7%; variante G20210A del FII: 4.9%; deficit di AT III: 6.1%; Tabella 7). Come è riportato in Tabella 9, la frequenza di queste varianti nel campione studiato è significativamente più

elevata rispetto a quella prevista e a quella presente nella popolazione generale.

L'ulteriore analisi degli altri fattori di rischio trombotico rilevati attraverso l'esame clinico e un'accurata anamnesi non ha mostrato differenze significative tra pazienti trombofilici e non trombofilici se si consideravano i seguenti parametri: esordio della patologia, contemporanea assunzione di contraccettivi, patologia oncologica, recente chirurgia (Tabella 8); né differenze significative si rilevavano al follow-up dei pazienti trombofilici con TVP dell'arto superiore rispetto ai non trombofilici con la medesima patologia se si consideravano l'incidenza di sanguinamenti maggiori, recidive tromboemboliche e mortalità a 3 mesi (Tabella 8).

Viceversa, l'incidenza di TVP dell'arto superiore è risultata statisticamente più frequente nei soggetti trombofilici che posizionavano un catetere venoso centrale a scopi terapeutici rispetto ai non trombofilici ($p < 0.05$, Tabella 8).

L'elevata incidenza di fattori protrombotici di tipo ereditario nel campione esaminato ha quindi confermato l'utilità di effettuare uno screening per la ricerca di questi fattori nei pazienti affetti da TVP dell'arto superiore, prendendo in esame almeno i parametri indicati in Tabella 9 che sono risultati significativamente associati alla malattia.

Abbiamo infine rivisitato i fattori di rischio per le trombosi venose profonde dell'arto superiore in una sottocategoria di pazienti ad alto rischio quali quelli affetti da patologia oncologica (122).

Pazienti affette da poliabortività

Abbiamo studiato 100 pazienti affette da poliabortività non spiegabile dalle comuni altre cause di abortività ricorrente. 88 pazienti presentavano abortività ricorrente nel primo trimestre di gestazione, 12 pazienti presentavano almeno un episodio abortivo del II o del III trimestre di gestazione. Dopo valutazione clinica, lo screening dei fattori protrombotici ereditari ha evidenziato un aumento significativo della frequenza allelica dei polimorfismi genetici C677T della MTHFR e 4G\5G del PAI-1 nel gruppo delle pazienti abortive rispetto alla frequenza nella popolazione generale. Attualmente è in corso uno studio più esteso per validare questi risultati preliminari. Il ruolo dei fattori protrombotici in ostetricia è stato inoltre oggetto di una nostra review sull'argomento recentemente pubblicata (123)

Pazienti affetti da pseudotumor cerebri

17 pazienti affetti da pseudotumor cerebri (Tabella 10) diagnosticato secondo i criteri di diagnosi internazionali proposti da Dandy nel 1937 (119) e modificati da Smith nel 1985 (120) sono stati sottoposti a screening per la valutazione di fattori protrombotici. Come confronto 51 soggetti senza anamnesi di patologia vascolare recente sono stati analizzati come gruppo di controllo. Tutti i pazienti presentavano elevati livelli di d-dimero e frammento protrombinico 1+2 rispetto ai controlli ($p < 0.0001$, Tabella 11) suggerendo la presenza di uno stato di ipercoagulabilità.

Dal nostro studio è emerso che alla base dell'ipercoagulabilità di tali pazienti non solo vi sono fattori acquisiti di trombofilia, come descritto già da altri reports (ad esempio la sindrome da anticorpi antifosfolipidi riscontrata anche in 8\17 pazienti anche nella nostra casistica, $p < 0.0001$, Tabella 11), ma anche cause di trombofilia genetica, legate alla presenza di varianti geniche come il fattore V Leiden, la variante protrombinica A20210G, la variante MTHFR C677T in omozigosi e quella del PAI 4G\5G, riscontrati in 13\17 soggetti. Tali dati, sebbene su una casistica numericamente limitata, hanno evidenziato un'associazione tra pseudotumor cerebri e fattori trombofilici non solo acquisiti, ma anche geneticamente determinati aprendo ulteriori prospettive nelle metodologie di screening di tale patologia (124) e sugli approcci terapeutici.

Pazienti affetti da tromboangioite obliterante (morbo di Buerger)

Sono stati studiati 9 pazienti affetti da morbo di Buerger, diagnosticato secondo i criteri di Shionoya (121). Dopo valutazione clinica e strumentale è stato programmato uno screening per la ricerca di iperomocisteinemia e della variante genica C677T della MTHFR. 2/9 presentavano valori borderline di omocisteinemia, mentre 7\9 mostravano un'iperomocistenemia moderata o elevata (Tabella 12); in 4/9 pazienti è stata inoltre evidenziata la presenza del genotipo TT della MTHFR, mentre i rimanenti 5\9 pazienti hanno evidenziato la medesima variante genica in eterozigosi (Tabella 12). Quindi, i nostri dati dimostrano un'associazione tra iperomocisteinemia e morbo di Buerger e tale

dato potrebbe avere anche un ruolo rilevante per il follow up e l'outcome di tali pazienti tramite un opportuno trattamento allo scopo di ridurre i livelli di omocisteinemia (ad esempio con supplementazione vitaminica). Tali risultati sono in corso di pubblicazione.

Pazienti con omozigosi per la variante G20210A della protrombina

Sei soggetti portatori della variante A20210G della protrombina riferiti al nostro Centro perchè affetti da patologia trombotica o per la presenza di un familiare di primo grado portatore della variante suddetta allo stato eterozigote, sono stati valutati dal punto di vista clinico-anamnestico. 4/6 soggetti presentavano evidenze cliniche di patologie trombotiche ad esordio precoce. Le patologie trombotiche riscontrate erano:

- trombosi venosa profonda in una giovane donna (27 aa) manifestatasi durante terapia contraccettiva;
- stroke ischemico ad esordio precoce (48 aa) in una femmina che non presentava altri fattori di rischio per aterotrombosi;
- sindrome coronarica ad esordio precoce in un maschio (40 aa) senza evidenza clinico-laboratoristica di altri fattori di rischio per aterotrombosi;
- aborti ricorrenti del primo e dell'ultimo trimestre in una giovane donna (34 aa) che non presentava altri fattori di rischio per abortività (Tabella 13).

Gli altri 2 soggetti studiati non presentavano rilievo clinico né anamnestico per patologie trombotiche sia del versante arterioso che venoso (Tabella 13). Una possibile causa di tale evidenza è risultata essere la concomitante patologia epatica determinata in un soggetto dall'abuso etilico e nell'altro dall'infezione cronica da parte del virus epatitico HCV. La patologia epatica cronica, se allo stato cirrotico, può infatti ridurre l'attività protrombinica in maniera significativa (anche oltre il 50%).

Il nostro studio ha quindi evidenziato che i soggetti portatori della variante omozigote A20210G della protrombina sono a rischio di patologia trombotica sia del versante arterioso sia del versante venoso anche ad esordio giovanile e che in alcune condizioni di co-morbidità, come le disfunzioni epatiche, tale predisposizione allo sviluppo di patologie vascolari può risultare modulata (125).

DISCUSSIONE

E' ben consolidata l'associazione tra alcune malattie trombotiche e la presenza di fattori predisponenti ereditari. In particolare, tali associazioni sono state confermate per il tromboembolismo venoso e per alcune forme di poliabortività. Viceversa, in letteratura sono presenti dati discordanti sull'associazione tra trombofilia ereditaria ed altre patologie, quali le sindromi coronariche acute (in particolare quelle ad esordio giovanile), le trombosi venose profonde degli arti superiori, il morbo di Buerger e lo pseudotumor cerebri. Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di selezionare una coorte di pazienti affetti da tali patologie allo scopo di sottoporli ad uno screening per la ricerca di varianti trombofiliche ereditarie per definirne il ruolo come potenziali fattori di rischio. Le ricadute di questo studio potranno svilupparsi sia a livello diagnostico che terapeutico. Infatti, una volta identificati dei fattori di predisposizione genetica ben definiti, sarà possibile ricercarli nei consanguinei del paziente affetto, e quindi identificare eventualmente altri membri predisposti prima che la malattia si sviluppi, intervenendo quindi sia sul piano terapeutico, sia attraverso la modulazione dei fattori di rischio ambientali. Inoltre, una volta chiarito che una malattia è associata a ben definiti fattori causali di tipo pretrombotico, in alcuni casi è possibile intervenire con terapie mirate (es. supporto vitaminico nei casi di iperomocisteinemia, profilassi anticoagulante, etc.).

Lo studio sul ruolo delle trombofilie ereditarie nelle sindromi coronariche acute (giovanili e non giovanili) ha escluso un'associazione con i

fattori protrombotici più comuni, quali FVL e variante A20210G della protrombina. D'altra parte, la maggior parte degli studi in letteratura associano questi fattori al rischio di patologie trombotiche di tipo venoso piuttosto che di tipo arterioso (6). Viceversa, sebbene vadano confermati su casistiche più ampie, i dati del nostro studio indicano come la variante genica HR2 del fattore V sia risultata presente con frequenza significativamente più alta nelle forme di SCA ad esordio giovanile vs quelle ad esordio non giovanile, e nelle SCA ad esordio non giovanile nei confronti della popolazione generale. La variante HR2 del fattore V è stata identificata quale responsabile di una anomala glicosilazione del fattore V cui si associerebbe una sua possibile anomalia funzionale in senso procoagulante; il ruolo patogenetico di questa variante in popolazioni con patologie trombotiche è ancora dibattuto (128).

Altro riscontro interessante è la frequenza significativamente più alta della variante genica V34L del fattore XIII nelle forme di SCA ad esordio non giovanile nei confronti della popolazione generale e nei confronti della popolazione di pazienti con SCA ad esordio giovanile; anche tale dato dovrà essere confermato in prossimi studi su casistiche più ampie. Tuttavia, questa variante genica è ritenuta responsabile di una ridotta fibrinolisi già in condizioni di eterozigosi, e sarebbe quindi responsabile di una conseguente trombofilia (129). Infine, abbiamo anche riscontrato il polimorfismo C677T della MTHFR con frequenza significativamente più elevata sia nelle SCA ad esordio non giovanile rispetto al gruppo di controllo. Questo risultato è meno sorprendente, poiché già diversi studi precedenti avevano correlato la variante

C677T dell'MTHFR a malattie trombotiche di tipo arterioso (130), come le patologie cerebrovascolari (130). D'altra parte, questa variante si associa alla presenza di una forma termolabile dell'enzima che non consente una corretta ri-metilazione della metionina con conseguente aumento dei livelli plasmatici dell'omocisteinemia (130).

Va da sé che l'impatto di questi risultati non è solo limitato ai pazienti portatori della specifica patologia vascolare; infatti, poiché i fattori predisponenti ereditari identificati vengono trasmessi con modalità mendeliana ed hanno carattere dominante, una volta identificata una variante genica potenzialmente casuale di fenotipo trombotico in un paziente sintomatico, attraverso una consulenza genetica l'analisi molecolare andrebbe estesa ai consanguinei e, una volta identificato un consanguineo a sua volta portatore della predisposizione protrombotica, valutare l'avvio di terapie profilattiche e stili di vita adeguati allo scopo di ridurre il rischio dello sviluppo della malattia.

I risultati da noi ottenuti sul ruolo delle trombofilie ereditarie nella patogenesi delle trombosi venose profonde dell'arto superiore hanno fornito diversi risultati. I pazienti selezionati, provenienti dal registro internazionale RIETE sul tromboembolismo venoso (TEV), che ha già analizzato più di 20.000 pazienti, sono stati circa 700. Solo per 181 di essi erano disponibili dati relativi allo screening dei fattori protrombotici ereditari. In circa il 45% (82\181) di essi è stata riscontrata la presenza di una o più varianti protrombotiche, confermando così l'importanza di un screening molecolare in

questi pazienti. Le varianti protrombotiche ereditarie maggiormente riscontrate sono state la variante genica del FVL con resistenza alla proteina C attivata, l'iperomocisteinemia e i deficit di anticoagulanti naturali, e ciò ha un notevole impatto sul piano terapeutico, poiché in tutti i tre casi è possibile adottare specifiche terapie deputate a contrastare il fattore predisponente. Inoltre, l'analisi multivariata che teneva in considerazione anche la presenza degli altri comuni fattori di rischio acquisiti per TEV analizzati in associazione o meno alla trombofilia molecolare, ha dimostrato che la presenza di un catetere venoso centrale è un ulteriore fattore di rischio trombotico in questi soggetti, con conseguente potenziale aumentata morbilità e rischio di recidive e morte.

Negli ultimi anni, il ruolo della trombofilia nella patogenesi dello pseudotumor cerebri sta assumendo un ruolo sempre più importante (131-132). Tuttavia, data la rarità della patologia e le difficoltà nella diagnosi precoce non sono presenti studi su ampia scala. I dati attualmente presenti in letteratura hanno sottolineato un potenziale ruolo patogenetico delle forme acquisite di trombofilia (131-132) mentre l'eventuale presenza di fattori protrombotici di tipo genetico sono stati descritti più raramente e su casistiche poco ampie. I nostri dati hanno dapprima confermato la presenza di un franco stato di ipercoagulabilità di tali pazienti indicato dalla presenza di marcatori di ipercoagulabilità quali d-dimero, frammento protrombinico 1+2 e fibrinopeptide A; quindi, anche il ruolo patogenetico degli anticorpi antifosfolipidi è stato confermato con significatività statistica nella nostra popolazione. Un'ulteriore ricerca sui fattori protrombotici di tipo ereditario ha

inoltre sottolineato la frequente presenza di alcune varianti geniche, in particolare della variante C677T della MTHFR in omozigosi, della variante 4G\5G del PAI-1 anch'essa in omozigosi e della variante inserzione\delezione dell'ACE anch'essa in omozigosi. Tali dati aprono nuove possibilità nell'approccio diagnostico della patologia essendo essa frequentemente ad esordio giovanile, e sulle potenziali terapie.

La patogenesi del morbo di Buerger è stata sempre oggetto di numerosi dibattiti scientifici. Diverse ipotesi sulla possibile associazione con alcune forme rare di vasculite o di trombofilia sono state formulate senza trovare successo se non in caso di casistiche poco ampie e/o casi clinici isolati (110-113). Tuttavia, anche in questo caso la rarità della patologia e le difficoltà di effettuare una diagnosi precoce anche per l'assenza di specifici markers non hanno facilitato le ricerche. Casistiche più ampie presenti in letteratura hanno ipotizzato un ruolo patogenetico dell'omocisteinemia senza trovare conferme da studi successivi (110-114); associazione non riscontrata nei reports presenti, invece, per il genotipo TT della MTHFR (114) frequentemente associato alla presenza di iperomocisteinemia. I dati da noi riportati hanno sottolineato la presenza di iperomocisteinemia in tutti i casi descritti. Nella popolazione da noi analizzata inoltre è stata riscontrata un'associazione con la variante genica C677T della MTHFR in omozigosi, che, come già detto, può essere causa di iperomocisteinemia. Tali risultati sono fortemente suggestivi di un ruolo patogenetico dell'iperomocisteinemia nel morbo di Buerger e sulla considerazione che almeno in una parte dei casi ciò dipende dalla presenza

della variante genica C677T della MTHFR Il dato importante è invece quello relativo al potenziale trattamento da associare per contrastare i livelli di omocisteinemia al fine di migliorare il follow up di tali pazienti, trattamenti ovviamente da associare a quelli già universalmente accettati basati su procedure chirurgiche, parachirurgiche e somministrazione parenterale di vasodilatatori (110).

L'ultimo spunto di discussione, riguarda i casi omozigoti per la variante A20210G della protrombina. Il ruolo della variante genica A20210G della protrombina è accettato universalmente nella patogenesi del tromboembolismo venoso specialmente ad esordio giovanile, mentre è molto dibattuto il potenziale ruolo della variante nelle forme di aterotrombosi. Tuttavia, quasi tutti i reports presenti in letteratura descrivono la presenza di tale variante genica in eterozigosi. Molto sporadici sono i riscontri della variante omozigote, e l'unica pubblicazione in tal senso ha dato discordanti riscontri, nel senso che dei circa 60 casi descritti nel mondo, solo in una metà è ben documentata una patologia trombotica (116). L'osservazione clinica prolungata da noi effettuata di 6 soggetti portatori di tale variante allo stato omozigote ha fornito qualche indicazione rilevante. Per 4 di essi era presente un esordio precoce di patologia trombotica nel 50% di essi interessava il versante arterioso che nel 50% di essi interessava i distretti venosi e solo sporadicamente è stata riscontrata la presenza di altri fattori di rischio trombotico. I 2 soggetti rimanenti non presentavano né rilievo clinico né anamnestico di patologia trombotica per la contemporanea co-morbidità

epatica di genesi etilica in un soggetto e di genesi post-virale nell'altro. Sulla base di tale osservazione possiamo dedurre che il genotipo omozigote per la variante A20210G della protrombina è usualmente associato ad esordio precoce di patologia trombotica anche in assenza di altri fattori di rischio acquisiti per la trombosi, che le manifestazioni trombotiche possono interessare sia il distretto arterioso che quello venoso e che le co-morbidità con trend ipocoagulativo come le disfunzioni epatiche avanzate possono modulare il fenotipo di tali soggetti.

In conclusione, anche se buona parte dei nostri dati andranno confermati su popolazioni più ampie, possiamo fissare alcuni punti preliminari quali:

1. la sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile potrebbe essere correlata a una predisposizione genetica legata all'effetto protrombotico della variante HR2 del fattore V; le forme ad esordio non giovanile sembrano avere una patogenesi diversa (almeno per ciò che riguarda la predisposizione genetica alla patologia), e sembrano essere associate alla variante C677T della MTHFR, correlata frequentemente all'iperomocisteinemia, e all'effetto procoagulante/ipofibrinolitico della variante V34L del fattore XIII;
2. le trombosi venose profonde dell'arto superiore sono frequentemente correlate a fattori protrombotici ereditari (così come altre forme di trombosi venose profonde di altri distretti);

3. il morbo di Buerger potrebbe, in una parte dei casi, essere correlato all'iperomocisteinemia e quindi alla presenza della variante C677T della MTHFR;
4. lo pseudotumor cerebri, patologia che interessa prevalentemente soggetti giovani di sesso femminile e che riconosce come fattori di rischio acquisiti il fumo, l'ovaio policistico e l'obesità, è associato a stato di ipercoagulabilità dovuta non solo a fattori acquisiti, come la sindrome da anticorpi antifosfolidi, ma anche a predisposizione genetica alla trombosi legata alla presenza di varianti geniche protrombotiche e/o ipofibrinolitiche;
5. l'omozigosi per la variante A20210G della protrombina può associarsi sia a patologie trombotiche venose che arteriose ed è possibile che una concomitante co-morbidità con patologie epatiche croniche (che allo stato cirrotico riducono l'attività procoagulante protrombinica) limiti lo sviluppo di tali patologie.

I dati qui riportati possono avere un impatto sul management clinico delle descritte patologie trombotiche. La ricerca degli stati trombofilici ereditari identificati nelle patologie trombotiche descritte, infatti, permette di identificare precocemente soggetti ad elevato rischio per i quali è ipotizzabile una profilassi primaria; inoltre dopo opportuna identificazione di tali soggetti è possibile estendere la ricerca di tali varianti geniche protrombotiche nei familiari di primo grado allo scopo di effettuare una profilassi primaria o secondaria laddove tali alterazioni siano ugualmente presenti.

Tabella 1. Principali fattori protrombotici ereditari

- deficit di antitrombina III
 - deficit di proteina C
 - deficit di proteina S
 - resistenza alla proteina C attivata (fattore V Leiden)
 - variante II A20210G
 - iperomocisteinemia (anche associata a varianti dell'enzima MTHFR)
-

Tabella 2. Fattori di rischio acquisiti per le patologie trombotiche venose

- Immobilizzazione
 - Stato post operatorio (ortopedia, ginecologia, chirurgia addominale maggiore)
 - Traumi
 - Età avanzata
 - Tumori maligni
 - Insufficienza cardiaca avanzata
 - Insufficienza venosa cronica
 - Gravidanza/puerperio
 - Contraccettivi orali
 - Obesità
 - Sindrome nefrosica
 - Sindrome da anticorpi antifosfolipidi (LAC\ACA\APA)
 - Trombofilie ereditarie
-

Tabella 3. Fattori di rischio acquisiti per le patologie trombotiche arteriose

Età avanzata

Familiarità per patologie cardiovascolari

Fumo di sigaretta

Obesità

Diabete mellito

Ipertensione arteriosa

Dislipidemia

Tabella 4. Frequenza allelica (%) delle varianti geniche protrombotiche in pazienti con sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile (SCAG) e pazienti con sindrome coronarica acuta ad esordio non giovanile (SCAnG). Con asterisco sono indicate le varianti significativamente diverse nei gruppi a confronto.

Variante genica	SCAG	Confronto	SCAnG
	(n = 264)	Fisher's test (p)	(n = 200)
FVL	4	0.48	3
FV HR2	6	0.01*	2
PTHRA20210G	5	0.59	3
MTHFR C677T	50	0.001*	66
MTHFR A1298C	23	0.42	21
HP1 a\b	54	0.9	19
PAI-1 4G\5G	46	0.04*	39
FIBR 455 A\G	21	0.57	19
F XIII V34L	21	0.004*	39

Tabella 5. Frequenza allelica delle varianti geniche protrombotiche in pazienti con sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile (SCAG) e soggetti di controllo della popolazione generale (CG). Con asterisco sono indicate le varianti risultate significativamente diverse nei gruppi a confronto.

Variante genica	SCAG	Confronto	CG
	(n = 264)	Fisher's test (p)	(n = 768)
FVL	4	0.69	2
FV HR2	6	0.05*	3
PTHRA20210G	5	0.66	3
MTHFR C677T	50	0.88	50
MTHFR A1298C	23	0.09	30
HP1 a\b	54	0.78	15
PAI-1 4G\5G	46	1.00	49
FIBR 455 A\G	21	0.77	18
F XIII V34L	21	0.65	20

Tabella 6. Frequenza allelica delle varianti geniche protrombotiche in pazienti con sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile (SCAG) e pazienti con sindrome coronarica acuta ad esordio non giovanile (SCAnG). Con asterisco sono indicate le varianti risultate significativamente diverse nei gruppi a confronto.

Variante genica	SCAnG	Confronto	GC
	(n = 200)	Fisher's test (p)	(n = 784)
FVL	3	0.07	2
FV HR2	2	0.27	3
PTHRA20210G	3	0.08	3
MTHFR C677T	66	0.00004*	50
MTHFR A1298C	21	0.01*	30
HP1 a\b	19	0.89	15
PAI-1 4G\5G	39	0.01*	49
FIBR 455 A\G	19	0.68	18
F XIII V34L	39	0.0001*	20

Tabella 7. Fattori protrombotici ereditari riscontrati nei pazienti affetti da trombosi venosa profonda dell'arto superiore.

Fattore	N di Casi	%
Iperomocisteinemia	20	24,4
Deficit di proteina C	2	2,4
Sindrome da anticorpi antifosfolipidi	14	17,1
Deficit di AT III	5	6,1
FVL	10	12,2
Variante A20210G del FII	4	4,9
Deficit di proteina S	3	3,7
Resistenza alla proteina C attivata	4	4,9
Altre trombofilie	6	7,3
Trombofilie combinate	14	17,1

Tabella 8. Altri fattori di rischio trombotico riscontrati nei pazienti con TVP arto superiore con e senza predisposizione trombofilica.

Variabile	Pazienti con TVP arto superiore trombofilici	Pazienti con TVP arto superiore non trombofilici	p
Età (< 50 vs > 50 aa)	54/82	73/26	0.24, ns
Contracezione (solo per donne < 50 aa)	8/42	16/48	0.15, ns
Presenza di catetere venoso centrale	61/82	86/99	0.03, s
Neoplasia	12/82	10/99	0.37, ns
Recente chirurgia	8/82	6/99	0.41, ns
Sanguinamento	3/82	4/99	0.60, ns
Recidiva Tromboembolica	2/82	4/99	0.69, ns
Morte	2/82	2/99	0.61, ns

Tabella 9. Valutazione statistica sull’impatto dei fattori di rischio protrombotico nei pazienti con TVP (Test One-Sample Kolmogorov-Smirnov).

Variabili	P	%
Iperomocisteinemia vs altre trombofilie	P < 0.001	(20\82; 24.4%)
Sindrome APS vs altre trombofilie	P < 0.001	(14\82; 17.1%)
Factor V Leiden vs altre trombofilie	P < 0.001	(10\82; 12.2%)
Prothrombin A20210G vs altre trombofilie	P < 0.01	(4\82; 4.9%)
Deficit di Proteina C vs altre trombofilie	P < 0.01	(2\82; 2.4%)
Deficit di Proteina S vs altre trombofilie	P < 0.01	(3\82; 3.7%)
Deficit di Antitrombina vs altre trombofilie	P < 0.01	(5\82; 6.1%)
APC resistenza vs altre trombofilie	P < 0.01	(4\82; 4.9%)

Tabella 10. Caratteristiche antropometriche dei pazienti affetti da Pseudotumor cerebri e soggetti del gruppo controllo.

	Pazienti (n = 17)	Gruppo controllo (n = 51)
Maschi	4	30
Femmine	13	21
Età media	31	32

Tabella 11. Valutazione dei fattori protrombotici in pazienti con Pseudotumor cerebri e soggetti del gruppo controllo (media \pm DS). L'asterisco indica i fattori significativamente diversi nella popolazione di pazienti, rispetto ai controlli della popolazione generale.

Parametri	Pazienti (17)	Controlli (51)	P value
PT (sec)	12 \pm 0,5	11,5 \pm 0,8	0.18
aPTT (sec)	30 \pm 2,5	31,5 \pm 3,4	0.09
Fibrinogeno (mg/dl)	340 \pm 80,7	360 \pm 68,2	0.32
AT III (%)	72 \pm 16,5	76 \pm 14,7	0.34
t-PA (ng/ml)	6,8 \pm 3,7	7,5 \pm 4,8	0.58
PAI-1 (ng/ml)	45.7 \pm 12.5	8.5 \pm 6.7	0.0001
FPA (ng/ml)	8.7 \pm 2.5	2.2 \pm 1.25	0.0001
F1+2 (nM/l)	5.7 \pm 1.15	0.45 \pm 0.35	0.0001
D-dimero (ng/ml)	375 \pm 65	225 \pm 75	0.0001
PC (%)	64 \pm 7.5	87 \pm 14.5	0.0001
PS (%)	97 \pm 23	103 \pm 12	0.16
Aβ₂IgM (UM/l)	14.5 \pm 6.8	0.38 \pm 0.25	0.0001
Aβ₂IgG (UG/l)	22.5 \pm 11.5	0.58 \pm 0.30	0.0001

Tabella 12. Livelli di omocisteinemia e polimorfismi genetici del gene MTHFR C677T in pazienti affetti da morbo di Buerger (n:9).

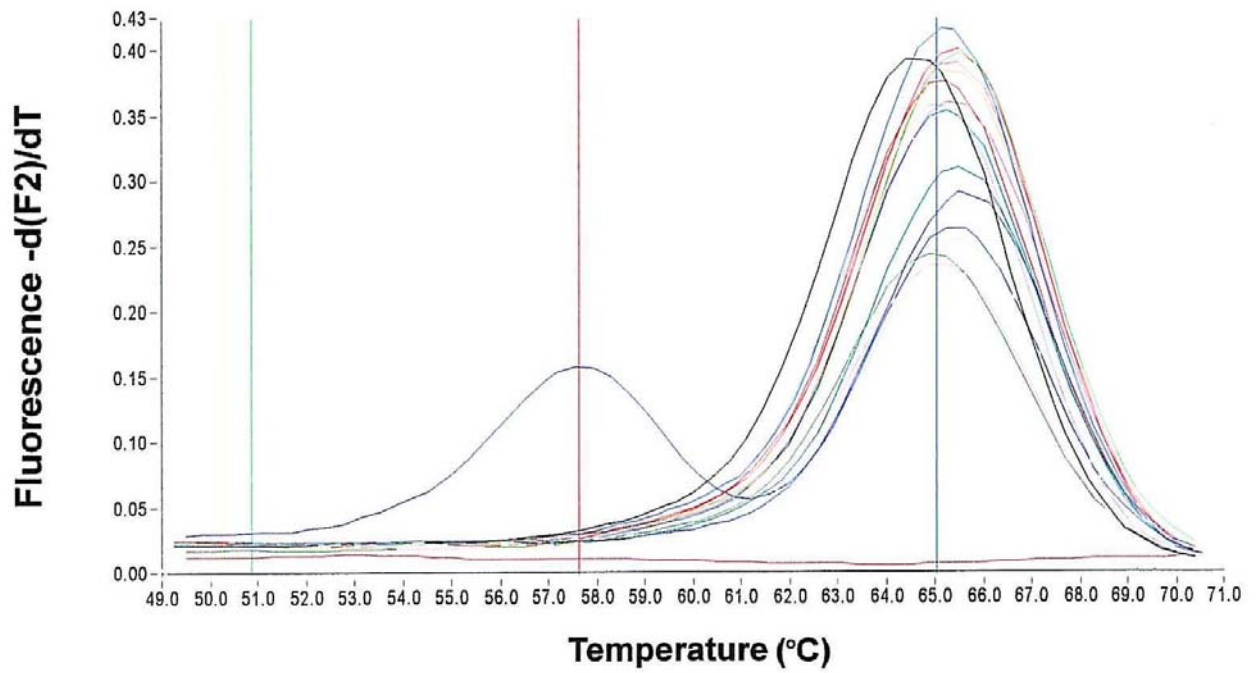
Pazienti	Omocisteinemia (mML)	MTHFR C677T
R.L. (M; 29 aa)	65	Omozigosi
M.B. (M; 25 aa)	19	Eterozigosi
P.B. (M; 31 aa)	34	Eterozigosi
E.S. (M; 37 aa)	15	Eterozigosi
S.M. (M; 38 aa)	71	Omozigosi
R.G. (F; 29 aa)	15	Omozigosi
S.C. (M; 38 aa)	25	Omozigosi
C.R. (F; 36 aa)	25	Eterozigosi
G.M. (M; 32 aa)	16	Eterozigosi

Tabella 13. Pazienti portatori del polimorfismo A20210G della protrombina in omozigosi e condizioni cliniche associate. TEV, tromboembolismo venoso; AR, abortività ripetuta; SCA, sindrome coronarica acuta

Pazienti	Omozigosi PTHRA20210G	Trombosi	Epatopatia	Età
A.B., (F)	Si	Si, TEV	No	27
C.M., (F)	Si	Si, stroke	No	48
C.D., (F)	Si	Si, AR	No	34
E.F., (M)	Si	Si, SCA	No	40
G.F., (M)	Si	No	Si	40
V.L., (M)	Si	No	Si	37

Figura 1 e 2. Curve di melting al termine dei cicli di amplificazione per la determinazione dei polimorfismi genetici analizzati.

Figura. 1



Digital Filter: Enabled

Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 8.8

Red cursor Tm = 57.6369

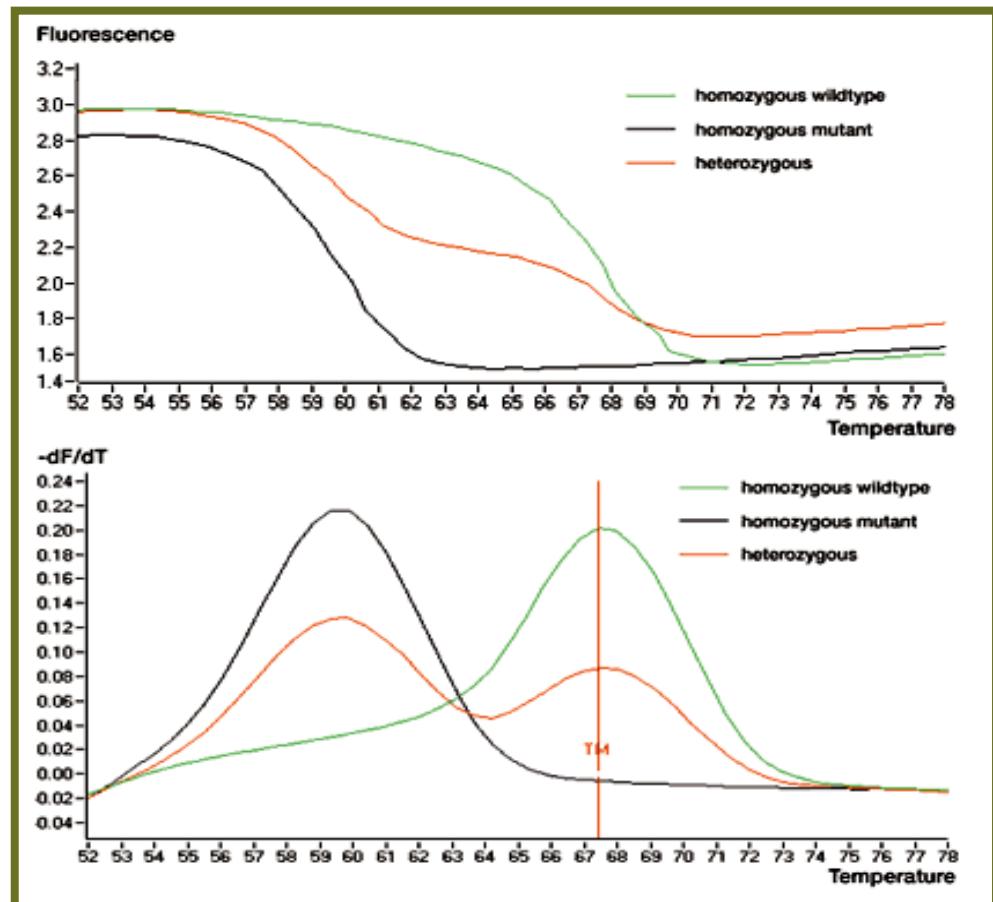
Yellow cursor Tm = 50.3141

Green cursor Tm = 50.8461

Color Compensation: Off

Blue cursor Tm = 65.0215

Figura 2.



Legenda alla figura 1 e 2.

Al termine della PCR si effettua l'analisi della curva di melting: la temperatura viene lentamente innalzata e man mano che le sonde si vanno staccando anche i due fluorofori non saranno più in stretta prossimità e quindi si osserva una diminuzione della fluorescenza. Così, se la mutazione è presente, la non totale complementarietà tra la sonda di mutazione ed il template destabilizza l'ibrido che si distaccherà prima, ovvero ad una temperatura più bassa rispetto al w.t. Il decadimento della fluorescenza verrà registrato in una curva di melting la cui derivata negativa raffigura le temperature di melting dei prodotti presenti in ogni campione, rivelando i genotipi che possono essere facilmente nominati.

Lettura

- Campione eterozigote → due punti di dissociazione (due picchi)
- Campione omozigote wild type → punto di dissociazione unico (picco unico)
- Campione omozigote mutato → punto di dissociazione unico ad una temperatura inferiore rispetto ad un campione omozigote wild type

Bibliografia

1. Mannucci PM. Venous thrombosis: the history of knowledge. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 209-212
2. Dawber TR, Moore FE and Mann GV. Coronary heart disease in the Framingham Study. *Am J Pub Health* 1957; 47 (Suppl): 4-24
3. Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol omeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47
4. Strong JP and Richards ML. Cigarette smoking and atherosclerosis in autopsied men. *Atherosclerosis* 1976; 23: 451-476
5. P Di Micco, M D'Uva. Editorial comment. To understand the two way clinical association between cancer and thrombophilia. *Exp Oncol* 2003; 25: 243-244
6. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 395-403
7. Martinelli I, Battaglioli T, Bucciarelli P, Passamonti SM, Mannucci PM. Risk factors and recurrence of primary deep vein thrombosis of the upper extremities. *Circulation* 2004; 110: 566-570
8. Salzman EW, Hirsh J (1994) The epidemiology, pathogenesis, and natural history of venous thrombosis. In Colman RW Hirsh J, Marder VJ, and Salzman EW (eds): *Hemostatis and Thrombosis: Basic*

Principles and Clinical Practice, ed 3. Philadelphia, JB Lippincott, pp 1275-1296

9. Mannucci PM, Cattaneo M, Martinelli I (1998) Le trombofilie ereditarie. Atti dei Congressi della Società Italiana di Medicina Interna, 99° Congresso-Bari 10-14 Novembre 1998, Ed. Pozzi. Roma
10. Virchow R, Phlogose und thrombose in Gefäßsystem. In Virchow R(ed): Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Frankfurt, von Meidinger Sohn, 1856, p 458
11. Bauer KA, Rosenberg RD. The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood* 1987; 70: 343
12. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1993; 119: 819
13. Shafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985; 98: 981
14. Osterud B, Rapaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260
15. Mann KG, Nesheim ME, Curch WR, et al. Surface-dependent reactions of vitamin-K dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; 76: 1
16. Gailani D, Broze GJ Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909

17. Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, et al. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* 1990; 76: 731
18. Rosenberg RD; Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973; 248: 6490
19. Rosenberg RD. Actions and interactions of antithrombin and heparin *N Eng J Med* 1975; 292: 146
20. Rosenberg JS, McKenna P, Rosenberg RD. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1975; 250: 8883
21. Stead N, Kaplan AP, Rosenberg RD. Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1976; 251: 6481
22. Kurachi F, Fujikawa K, Scheimer G, et al. Inhibition of bovine cofactor XIa and antithrombin in the presence and absence of heparin. *Blood* 1976; 67:1488
23. Lawson JH, Butenas S, Ribarik N, et al. Complex dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J Biol Chem* 1993; 268: 767
24. Rao LVM, Rapaport SI, Hoang AD. Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa *Blood* 1993; 81: 2600
25. Demers G, Ginsberg JS, Hirsh J, et al. Thrombosis in antithrombin III-deficient persons: Report of a large kindred and literature review. *Ann Inter Med* 1992; 116: 754

26. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: The Protein C system. *N Eng J Med* 1986; 314: 1298
27. Esmon CT. The roles of Protein C and Thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743
28. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathway. *Science* 1989; 235: 1348
29. Kisiel W, Canfield WM, Ericson LH, et al. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 1977; 16: 5824
30. Walker FJ, Sexton PW, Esmon CT. The inhibition of blood coagulation by activated Protein C through the selective inactivation of activated factor V. *Biochem Biophys Acta* 1979; 571: 333
31. Fulcher GA, Gardiner JE, Griffin JH, et al. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984; 63: 486
32. Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. Mechanism of activation of human activated protein C, a thrombin dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 1982; 59: 1067.
33. Walker FJ. The regulation of activated protein C by a new protein: The possible function of bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; 255: 5521
34. Di Sipio RG and Davie EW. Characterisation of Protein S, a carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* 1979; 18: 899

35. Dahlback B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2512
36. Lindahal AK, Sandset PM, Abilgaard U. The present status of tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3: 439
37. Sandset PM, Albigaard U, Larsen ML. Heparin induced release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1989; 50: 813.
38. Broze GJ Jr. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol* 1992; 29: 159.
39. Wilman B, hamsten A. The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Sem Thromb Hemost* 1990; 16: 20753
40. Malm J, Laurell M, Nilsson IM, et al. Thromboembolic disease-critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992; 68 :7
41. Vikydal R, Korninger C, Kyrle PA, et al. The prevalance of hereditary antithrombin III deficiency in patients with a history of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1985; 54: 744
42. Kauffman RH, Veltkamp JJ, Van Tilburg NH, et al. Acquired antithrombin III deficiency and thrombosis an the nephrotin syndrome. *Am J Med* 1978; 65: 607

43. Damus PS, Wallace GA. Immunologic measurement of antithrombin III-heparin cofactor and alfa2-macroglobulin in disseminated intravascular coagulation and hepatic failure coagulopathy. *Thromb Res* 1989; 6: 27
44. Wennink GH, Kahale LH, Lamping RJ, et al. Antithrombin III in oral contraceptive users and during normotensive pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 63: 57
45. Caine Yg, bauer KA, Barzegar S, et al. Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women *Thromb Haemost* 1992; 68: 392
46. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370
47. Broekmans AW, Veltkamp JJ, Bertina RM. (1983) Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism: A study of three Dutch families. *N Engl J Med* 1983; 309: 340
48. Bovill EG, Bauer KA, Dickerman JD, et al. The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989; 73: 712
49. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984; 311: 1525
50. Engesser L, Broekmans AW, Briet E, et al: Hereditary protein S deficiency: Clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1987; 106: 677

51. D'Angelo SV, Comp PC, Esmon CT, et al. Relationship between protein C antigen and anticoagulant activity during oral anticoagulation and in selected disease states. *J Clin Invest* 1986; 77: 416
52. Mannucci PM, Viganò S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982; 2: 463
53. Griffin JH, Mosher DF, Zimmermann TS, et al. Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982; 60: 261
54. Comp PC, Thurnau GR, Welsh J. Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood* 1986; 68: 881
55. D'Angelo A, Viganò-D'Angelo S, Esmon CT, et al. Acquired deficiency of protein S: protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease and in disseminated intravascular coagulation. *J Clin Invest* 1988; 81: 1445
56. Heeb MJ, Mosher DF, Griffin JH. Activation and complexation of protein C and cleavage and decrease of protein S in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1989; 73: 455
57. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 100471

58. Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1396
59. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 6473.
60. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, et al. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989
61. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. *N. Eng J Med* 1994; 330:517
62. Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *The Lancet* 1995; 346: 1593-1596
63. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N. Eng J Med.* 1995; 332: 912-17.
64. Marinella MA, Greene K (1999) Bilateral Thalamic Infarction in a Patient with Factor V Leiden Mutation. *Mayo Clinics Proceedings.* 1999; 74: 795-797

65. 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: 3698-703
66. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26: 6165-77
67. Mudd SH, Levy HL, Skovby F (1995) Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngarden JB, Fredrickson DS, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York:McGraw-Hill: 1279-1327.
68. Cattaneo M., Rota Vender L, 1998 Iperomocisteinemia e trombosi. *Recenti Progressi in Medicina*, vol 89, Suppl al N 10.
69. López-Jiménez L, Montero M, González-Fajardo JA, Arcelus JI, Suárez C, Lobo JL, Monreal M; RIETE Investigators. Venous thromboembolism in very elderly patients: findings from a prospective registry (RIETE). *Haematologica*. 2006; 91: 1046-51.
70. Arcelus JI, Monreal M, Caprini JA, Guisado JG, Soto MJ, Núñez MJ, Álvarez JC; RIETE investigators. Clinical presentation and time-course of postoperative venous thromboembolism: Results from the RIETE Registry. *Thromb Haemost*. 2008; 99: 546-51.
71. P Di Micco, M Amitrano, A Niglio, A Fontanella. Molecular and clinical conditions associated with venous thromboembolism in oncological patients. *Exp Oncol* 2006; 28: 194-197

72. Lobo JL, Zorrilla V, Aizpuru F, Uresandi F, Garcia-Bragado F, Conget F, Monreal M. Clinical syndromes and clinical outcome in patients with pulmonary embolism: findings from the RIETE registry. *Chest*. 2006; 130: 1817-22.
73. Monreal M, Muñoz-Torrero JF, Naraine VS, Jiménez D, Soler S, Rabuñal R, Gallego P; RIETE Investigators. Pulmonary embolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease or congestive heart failure. *Am J Med*. 2006; 119: 851-8.
74. Rickles FR, Levine MN, Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematologica* 2001; 106: 6-12
75. Gomes MP, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1965-76.
76. Kojima S, Nonogi H, Miyao Y, Miyazaki S, Goto Y, Itoh A, Daikoku S, Matsumoto T, Morii I, Yutani C. Is preinfarction angina related to the presence or absence of coronary plaque rupture? *Heart* 2000; 83: 64-68
77. Yamagishi M, Terashima M, Awano K, Kijima M, Nakatani S, Daikoku S, Ito K, Yasumura Y, Miyatake K. Morphology of vulnerable coronary plaque: insights from follow up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 106-111

78. Eisenberg PR, Sherman LA, Perz J, Jaffe AS. Relationship between elevated plasma levels of crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP) and the clinical presentation of patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1987; 46: 109-120
79. Derhaschnig U, Laggner AN, Roggla M, Hirschl MM, Kapiotis S, Marsik C, Jilma B. Evaluation of coagulation markers for early diagnosis of acute coronary syndromes in emergency room. *Clin Chem* 2002; 48: 1924-1930k
80. Eisenberg PR, Sherman LA, Schectman K et al. Fibrinopeptide A: a marker of acute coronary thrombosis. *Circulation* 1985; 71: 912-918
81. Bayes-Genis A, Mateo J, Santalo M, Oliver A, Guindo J, Badimon L, Martinez-rubio A, Fontcuberta J, Schwartz RS, De Luna AB. D-Dimer is an early diagnostic marker of coronary ischemia in patients with chest pain. *Am Heart J* 2000; 140: 379-384
82. Koenig W, Rothenbacher D, Hoffmeister A, Griesshammer M, Brenner H. Plasma fibrin D-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1701-1705
83. Di Micco P, D'Uva M, Strina I, Mollo A, Amato V, Niglio A, De Placido G. The role of d-dimer as first marker of thrombophilia in women affected by sterility: implications in pathophysiology and diagnosis of thrombophilia-induced sterility. *J Transl Med.* 2004; 2: 3

84. Rosendaal FR, Siskovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-1750
85. Doggen CJM, Manfer Cats V, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors. Increased risk of myocardial infarction of factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998; 97: 1037-1041
86. Arruda VR, Siquiera LH, Chiaparini LC, Cohelo OR, Mansur AP, Ramires A, Annichino-Bizzacchi JM. Prevalence of the prothrombin gene variant 20210 G→A among patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 42-45
87. Ferraresi P, Marchetti G, Legnani C, Cavallari C, Castoldi E, Mascoli F, Ardissino D, Palareti G, Bernardi F. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc* 1997; 17: 2418-2422
88. Croft SA, Daly ME, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Hampton KK. The Prothrombin 20210A Allele and its Association with Myocardial Infarction. *Thromb Haemost* 1999;81:861-864
89. Donmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K, Demir M, Demirtas M, Cayli M, Alhan C, Baslamisli F. Prothrombin 20210GA and Factor V

- Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *JPN Heart J* 2004; 45: 505-512
90. Middenforf K, Gohring P, Huehns TY, Seidel D Steinbeck, Nikol S. Prevalence of resistance against activated protein C resulting from factor V Leiden is significantly increased in myocardial infarction: investigation of 507 patients with myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 147: 897- 904
91. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood* 1996; 87: 3531-3544
92. Kearon C, Ginsberg JS, Hirsh J. The role of venous ultrasonography in the diagnosis of suspected deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Ann Intern Med.* 1998; 129: 1044-9.
93. Martinelli I, Cattaneo M, Panzeri D, Taioli E, Mannucci PM. Risk factors for deep venous thrombosis of the upper extremities. *Ann Intern Med* 1997; 126: 707-711
94. Prandoni P, Polistena P, Bernardi E, Cogo A, Casara D, Verlato F, Angelini F, Simioni P, Signorini GP, Benedetti L, Girolami A. Upper-extremity deep vein thrombosis. Risk factors, diagnosis and complications. *Arch Intern Med* 1997; 157: 57-62
95. Enevoldson TP, Russell RW. Cerebral venous thrombosis: new causes for an old syndrome? *Q J Med* 1999; 77: 1255-75

96. Finsterer J, Kuntscher D, Brunner S, Krugluger W. Pseudotumor cerebri from sinus venous thrombosis associated with polycystic ovary syndrome and hereditary thrombophilia. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23: 179-182
97. Glueck CJ, Aregawi D, Goldenberg N, Golnik KC, Sieve L, Wang P. Idiopathic intracranial hypertension, polycystic-ovary syndrome, and thrombophilia. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 72-82
98. Glueck CJ, Iyengar S, Goldenberg N, Smith LS, Wang P. Idiopathic intracranial hypertension: association with coagulation disorders and polycystic-ovary syndrome. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 35-45
99. Glueck CJ, Goldenberg N, Golnik K, Sieve L, Wang P. Idiopathic intracranial hypertension: association with thrombophilia and hypofibrinolysis in men. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 441-448
100. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999; 82, 6-9
101. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. 2002. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*, 17:1633-1637
102. Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. 2002. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol*, 71:300-305

103. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addeda M, Cappucci G, Vecchione G. 1997. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost*, 77:822-824
104. Sanson BJ, Fierich PW, Simioni P, Zanardi S, Hilsman MV, Girolami A, ten Cate JW, Prins MH. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C, and protein S deficient women. *Thromb Haemost* 1996; 75, 387-388
105. Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai AP, Fedi S. 2000. Angiotensin convertine enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 11:657-662
106. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz J, Abramovicic H. 1999. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol*, 181:126-130.
107. Nelen WLDM, van der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EAP, Eskes TKAB. 1997. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related distrubances in folate and homocysteine metabolism. *Br J Hosp Med*, 58:511-513

108. De Falco M, Pollio F, Scaramellino M, Pontillo M, Lieto AD. Homocysteinaemia during pregnancy and placental disease. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2000; 27: 188-90
109. Fiessinger JN. Juvenile arteritis revisited. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 295-298
110. P. Di Micco, A. Niglio, O. Scudiero, B. Bonamassa, I. Martinelli, R. Di Fiore, G. Castaldo and F. Salvatore. A case of Buerger's disease associated with MTHFR_{C677T} mutation homozygosity: a possible therapeutic support. *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis* 2004; 14: 225-226
111. Caramaschi P, Biasi D, Carletto A, Friso S, Girelli D, Arcaro G, Bambara LM. Three cases of Buerger's disease associated with hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Rheumatol.* 2000; 18: 264-5
112. Stammler F, Diehm C, Hsu E, Stockinger K, Amendt K. The prevalence of hyperhomocysteinemia in thromboangiitis obliterans. Does homocysteine play a role pathogenetically? *Dtsch Med Wochenschr* 1997; 122: 1062-1063
113. Glueck CJ, Haque M, Winarska M, Dharashivkar S, Fontaine RN, Zhu B, Wang P. Stromelysin-1 5'6' and eNOS T-786C polymorphisms, MTHFR C677T and A1298C mutations, and cigarette-cannabis smoking: a pilot, hypothesis-generating study of gene-environment pathophysiological associations with Buerger's disease. *Clin Appl Thromb Haemost* 2006; 12: 427-439

114. Kawasaki T, Fujimura H, Kakinoki E, Uemichi A, Miyata T. Is there a role for genetic polymorphism of C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Buerger's disease? *Thromb Haemost* 2000; 84: 736-737
115. Hillarp A, Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B. The 20210 allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1997; 78:990-992
116. Bosler D, Mattson J, Crisan D. Phenotypic heterogeneity in patients with homozygous prothrombin 20210 AA genotype. A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2006; 8:420-425
117. Braunwald E, Antmann EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS et al. ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). www.acc.org
118. Fuster V. 50th anniversary historical article. Acute coronary syndromes: the degree and morphology of coronary stenoses. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1854-1856

119. Dandy WE. "[Intracranial pressure without brain tumor - diagnosis and treatment](#)". Ann Surg 1937; 106 (4): 492–513
120. Smith JL (1985). "Whence pseudotumor cerebri?". Journal of clinical neuro-ophthalmology 1985; 5: 55–6
121. Shionoya S. Buerger's disease: diagnosis and management. Cardiovasc Surg 1993; 1: 207-214
122. P Di Micco, R Di Fiore, S Quaranta, G V Viggiano, I J Romano, A Niglio, A Fontanella, B De Simone, A Angiolillo, G Castaldo. Upper limb deep vein thrombosis: update in risk factors in oncological patients. Cancer Therapy 2007; 5: 391-394
123. Di Micco P, D'Uva M, Strina I, De Placido G, Di Fiore R, Quaranta S, Castaldo G. Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. Clin Lab 2007; 53: 309-314
124. De Lucia D, Napolitano M, Di Micco P, Niglio A, Fontanella A, Di Iorio G. Benign intracranial hypertension associated to blood coagulation derangements. Thromb J 2006; 4: 21
125. Di Micco P, Di Fiore R, Niglio A, Quaranta S, Angiolillo A, Cardillo G, Castaldo G. Different outcome of six homozygotes for prothrombin A20210A gene variant. J Transl Med. 2008;6:36
126. Wolf CE, Haubelt H, Pauer HU, Hinney B, Krome-Cesar C, Legler TJ, Hellstern P, Emons G, Zoll B, Kholer M. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, F II G20210A and

- polymorphism of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 134-137
127. Onalan O, Balta G, Oto A, Kabakci G, Tokgozoglu L, Aytemir K, Altay C, Gurgey A, Nazli N. Plasminogen activator inhibitor-1 4G4G genotype is associated with myocardial infarction but not with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2007; in press
128. Pecheniuk NM, Morris CP, Walsh TP, Marsh NA. The factor V HR2 haplotype: prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 201-206
129. Sucker C, Farokhzad F, Kurschat C, Grabensee B, Scharf RE, Zotz RB, Marhun-Debowski B, Hetzel GR. The homozygous leu variant of the factor XIII val34leu as a risk factor for the manifestation of thrombotic microangiopathies. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007; in press
130. Towfighi A, Saver JL, Engelhardt R, Ovbiagele B. Factors associated with the steep increase in late-midlife stroke occurrence among US men. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008; 17: 165-168
131. Glueck CJ, Goldenberg N, Golnik K, Sieve L, Wang P. Idiopathic intracranial hypertension: associations with thrombophilia and hypofibrinolysis in men. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 441-448
132. Dunkley S, Johnston I. Thrombophilia as common predisposing factor in pseudotumor cerebri. *Blood* 2004; 103: 1972-1973