

Correlazione tra mutazione del fattore V di Leiden e aborti spontanei ricorrenti

A. MILITELLO, M. ROMANO, E. LO MAGNO, R. GIORDANO, L. GIUFFRIDA, C. NAPOLI

RIASSUNTO: Correlazione tra mutazione del fattore V di Leiden e aborti spontanei ricorrenti.

A. MILITELLO, M. ROMANO, E. LO MAGNO, R. GIORDANO, L. GIUFFRIDA, C. NAPOLI

Le mutazioni del gene che codifica per il fattore V (fattore V di Leiden) e del gene per la protrombina in sostituzione di una G (guanina) con una A (adenina) in posizione 20210 sono le cause più comuni di trombofilia ereditaria. Il rischio relativo di trombosi venose profonde ricorrenti è aumentato nei pazienti eterozigoti sia per la mutazione del fattore V di Leiden che per la mutazione G20210A della protrombina. Le donne portatrici di queste mutazioni sono anche ad aumentato rischio di aborti. La causa degli aborti ripetuti è spesso sconosciuta, anche se l'ipercoagulabilità e gli infarti placentari sono stati proposti come possibili fattori etiologici.

È stato recentemente descritto un difetto della fibrinolisi, conosciuto come resistenza alla proteina C attivata. In molti casi questa resistenza è dovuta alla mutazione puntiforme nel gene che codifica per il fattore V di Leiden. Questa mutazione gioca un ruolo importante in alcuni casi di aborti spontanei ricorrenti inspiegati.

SUMMARY: Correlation between factor V of Leiden mutation and recurrent pregnancy loss.

A. MILITELLO, M. ROMANO, E. LO MAGNO, R. GIORDANO, L. GIUFFRIDA, C. NAPOLI

Point mutations in the factor V gene (factor V of Leiden) and prothrombin gene (the substitution of A for G at position 20210) are the most common causes of inherited thrombophilia. The relative risk of spontaneous recurrent deep venous thrombosis is increased in patients who are heterozygous for both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutations. Women who carry these mutations are also at increased risk for pregnancy loss. The cause of recurrent pregnancy loss is in most cases unknown, although hypercoagulability and placental infarctions have been proposed as etiologic factors. An inherited defect in anticoagulation, known as resistance to activated protein C, has recently been described. In most cases, this resistance results from the point mutation in the gene coding for coagulation factor V. This mutation plays a role in some cases of unexplained recurrent pregnancy loss.

KEY WORDS: Fattore V di Leiden - Protrombina - Trombofilia ereditaria - Aborti ricorrenti - Trombosi.
Factor V of Leiden - Prothrombin - Inherited thrombophilia - Recurrent pregnancy loss - Thrombosis.

Introduzione

Sono denominate complicate o a rischio, quelle gravidanze nelle quali esistono condizioni patologiche reali o potenziali (fattori di rischio) che possono compromettere la salute o la vita della madre, del feto o di entrambi.

Queste condizioni patologiche sono, appunto, alla base della morbilità e della mortalità materna fetale e neonatale.

La mortalità perinatale è oggi intorno al 10%, il che rappresenta un grande miglioramento in considerazione dei dati della fine degli anni '60 in cui era superiore al 30%.

Ciò grazie al diffondersi delle misure preventive e al miglioramento dell'assistenza.

La mortalità materna si attesta tra il 4 e il 7 su 100.000 nati vivi.

Tra i fattori di rischio, si è visto che uno dei più importanti, nel determinare una gravidanza a rischio, è la trombofilia, intesa come una condizione clinica in cui la paziente dimostra, per cause congenite o acquisite, una inusuale predisposizione alla trombosi arterovenosa.

Molteplici cause, genetiche o acquisite, sono oggi note come predisponenti alla trombosi. Tra le cause genetiche più frequenti vi sono la mutazione G1691A del ge-

ne del fattore V (fattore V di Leiden) (Bertina et al.).

Nel 1993 lo svedese Dahlback osservò che il tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), eseguito sul plasma di alcuni individui con trombosi venosa appartenenti ad una stessa famiglia, non veniva prolungato dall'aggiunta di Proteina C attivata.

Normalmente, l'aggiunta di Proteina C attivata, causa un prolungamento dell'aPTT, dovuto all'inibizione dei fattori V e VIII attivati, che sono appunto i substrati su cui la Proteina C attivata svolge la sua azione inibitoria.

L'anomalia osservata è stata di conseguenza denominata "resistenza alla Proteina C attivata", ad indicare il comportamento del test funzionale.

Poco tempo dopo è stata identificata la causa della resistenza della Proteina C attivata, che risiedeva in una singola mutazione (adenina al posto di guanina) nel nucleotide 1691 del gene che codifica per il fattore V.

Il fattore V sintetizzato in presenza della mutazione risulta avere una sostituzione aminoacidica (glutamina al posto di arginina) in posizione 506, vale a dire proprio in uno dei siti di legame con la Proteina C attivata.

La scoperta del difetto molecolare è avvenuta in un laboratorio della cittadina olandese di Leiden, e per questo motivo la mutazione del fattore V viene chiamata "fattore V di Leiden".

Dunque il fattore V attivato è un cofattore essenziale per l'attivazione della *protrombina* (fattore II) a *trombina*. Il suo effetto pro-coagulante è normalmente inibito dalla Proteina C attivata che taglia il fattore V attivato in tre parti. Un sito di taglio è localizzato nell'aminoacido arginina alla posizione 506.

Una **mutazione** del gene che codifica per il fattore V, a livello della tripletta nucleotidica che codifica per l'**arginina** in 506 (nucleotide 1691), con sostituzione di una **G** (guanina) con una **A** (adenina), comporta la sostituzione dell'arginina con un altro aminoacido, la glutamina, che impedisce il taglio da parte della Proteina C attivata. Ne consegue una resistenza alla Proteina C attivata (APC) nei test di laboratorio ed una maggiore attività pro-coagulante del fattore V attivato che predispone alla trombosi. Tale evento trombotico è favorito in presenza di altre condizioni predisponenti quali la gravidanza, l'assunzione di contraccettivi orali (rischio aumentato di 30 volte negli eterozigoti e di alcune centinaia negli omozigoti), gli interventi chirurgici. In gravidanza una condizione genetica di eterozigosi per il fattore di Leiden è considerata predisponente all'aborto spontaneo, alla eclampsia, ai difetti placentari, alla Sindrome HELLP (emolisi, elevazione enzimi epatici, piastrinopenia).

Tali manifestazioni sarebbero legate a trombosi delle arterie spirali uterine con conseguente inadeguata perfusione placentare. I soggetti portatori di mutazione del fattore V di Leiden dovrebbero pertanto sottoporsi a profilassi anticoagulativa in corso di gravidanza o in fun-

zione di interventi chirurgici ed evitare l'assunzione di contraccettivi orali.

Epidemiologia

La sindrome di Leiden è una patologia relativamente comune: solo in Italia sono circa 2.000.000 (3-4% della popolazione) i soggetti portatori della mutazione. La variante **G1691A**, definita **variante di Leiden**, ha una frequenza genica dell'**1,4-4,2%** in Europa con una frequenza di portatori in eterozigosi in Italia pari al **2-3%**, mentre l'omozigotità per tale mutazione ha un'incidenza di **1:5000**.

I soggetti *eterozigoti* hanno un **rischio 8 volte superiore** di sviluppare una trombosi venosa, mentre gli *omozigoti* hanno un rischio pari ad 80 volte.

La resistenza alla Proteina C attivata può essere sospettata in soggetti giovani (con meno di 40 anni) che abbiano avuto episodi trombotici specie se ricorrenti o che presentino una storia familiare positiva per trombosi venosa profonda degli arti inferiori, embolie polmonari, tromboflebiti dei vasi superficiali e in donne che abbiano manifestato episodi trombotici durante la gravidanza o in seguito all'assunzione di contraccettivi orali.

Materiali e metodi

Abbiamo condotto uno studio caso-controllo su 260 pazienti per determinare la prevalenza della mutazione del fattore V di Leiden in 52 donne con aborti ricorrenti (casi) rispetto a 208 donne in postmenopausa senza storie di aborti (controlli).

I criteri per l'inclusione nel gruppo dei casi sono stati: 1) anamnesi con 3 o più aborti spontanei ricorrenti; 2) assenza di familiarità per malattie cromosomiche.

Delle 60 pazienti sottoposte a screening, 8 sono state escluse per una quantità di aborti ricorrenti inferiore a tre prima della 24^a settimana di gestazione. Così i casi-pazienti adatte per l'analisi genetica sono state 52.

I controlli sono pazienti che sono state scelte per l'assenza in anamnesi di infezioni miocardiche, ictus, tumori maligni, dopo aver risposto a un questionario riguardante le caratteristiche demografiche, l'anamnesi e le informazioni sullo stile di vita. In particolare sono state poste domande più specifiche, come ad esempio l'età del menarca, il numero delle gravidanze a termine e quelle concluse prima della 24^a settimana. Delle donne che hanno riportato almeno una gravidanza a termine e nessun aborto, sono state scelte a random, come controlli, 208 donne.

Tutte le donne sono state sottoposte ad esami per individuare il fattore V. I test sono stati i seguenti:

1) test di screening di seconda generazione per indi-

viduare la resistenza alla Proteina C attivata, utilizzando il plasma con il fattore V alterato;

2) test di conferma genetica attraverso la tecnica della PCR (*polymerase chain reaction*) per i risultati borderline o ai limiti inferiori. Per mezzo della PCR viene isolato e amplificato un frammento del gene del fattore V dove può essere presente la mutazione. Il prodotto dell'amplificazione viene digerito con un enzima di restrizione, in grado di identificare la mutazione; i frammenti ottenuti sono quindi separati elettroforeticamente. Il riscontro della mutazione permette la conferma del sospetto diagnostico.

Risultati

I casi rispetto ai controlli avevano una media (4,6 rispetto a 4,0) e una mediana (4,0 rispetto a 4,0) simile per numero di gravidanze. Il numero di gravidanze a termine è stato maggiore nei controlli (media 3,0; mediana 3,0, con un range 1-6) rispetto ai casi (media 0,5; mediana 0,0, range 0-5). La media del numero di aborti tra i casi è stata di 3,9; mediana 3,0 con range 3-11; comunque di queste donne il 40,7% ha avuto almeno una gravidanza a termine. In un sottogruppo di casi con nessuna gravidanza a termine il 9% possedeva la mutazione del fattore V di Leiden. In contrasto, un altro sottogruppo di 16 casi che hanno avuto almeno un successo di gravidanza, il 4,3% era portatore della mutazione.

Nessun caso con test positivo agli anticorpi anticardiolipina o antifosfatidilserina ha avuto test positivo per il Lupus Anticoagulant o altre anomalie della coagulazione. Due pazienti senza mutazione del fattore V hanno avuto almeno una di queste alterazioni. L'età media del menarca non è in relazione con lo stato di portatore della mutazione del fattore V di Leiden (12,6 rispetto a 12,5).

Discussione

I nostri studi confermano l'ipotesi che la mutazione del fattore V di Leiden, il più comune fattore predisponente ereditario di trombosi, gioca un ruolo in alcuni casi di aborti ricorrenti inspiegati. In base ai nostri studi l'associazione tra mutazione del fattore V di Leiden e aumento del rischio di aborti ricorrenti è di 2,2.

La possibilità che la trombosi placentare sia un fattore etiologico in alcuni casi di aborti spontanei ricorrenti può essere in relazione alla Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi o ad alterazioni del fattore XII della coagulazione o della fibrinolisi.

Comunque queste anomalie sono abbastanza rare, più comune è invece la mutazione per il fattore V di Leiden. Così la possibilità che questa mutazione contribui-

sca all'ipercoagulabilità in gravidanza riveste importanza fisiopatologia e clinica. È anche possibile l'instaurarsi di una mutazione "de novo" alla Proteina C attivata che si sviluppa in gravidanza in donne senza mutazione per il fattore V di Leiden, e questo un rischio di tromboembolismo venoso in gravidanza.

Hellgren et al. (*Am J Obstet Gynecol* 1995;173:210) hanno trovato che 20 su 34 donne con tromboembolismo venoso in gravidanza (59%) avevano la resistenza alla Proteina C attivata. Questo studio però include eventi non sempre confermati con metodi obiettivi e il dato funzionale non è stato confermato dall'analisi genetica. Due altri piccoli studi su donne afferenti a reparti ostetrici con gravidanze complicate da tromboembolismo venoso hanno aggiunto informazioni sul ruolo del fattore V di Leiden. Hallack et al. (*Am J Obstet Gynecol* 1997;176:889) hanno descritto 15 donne ricoverate nell'arco di due anni per tromboembolismo venoso o patologia cerebrovascolare, 7 delle quali portatrici della mutazione Leiden (4 embolie polmonari, 2 trombosi venose profonde, 1 trombosi venosa cerebrale). Dizon-Townson et al. (*Am J Obstet Gynecol* 1997;176:883) hanno testato 407 pazienti ostetriche per il fattore V di Leiden, trovando una prevalenza del 3%. Delle 14 donne portatrici, 4 avevano sviluppato tromboembolismo venoso nella seconda metà della gravidanza o in puerperio. Un altro studio di Hirsh et al. (*Am Heart J* 1996;131:1145), ha osservato che su 35 donne con tromboembolismo venoso in gravidanza 6 (17%) erano portatrici del fattore V di Leiden, 5 delle quali avevano altri difetti trombofilici (deficit degli anticoagulanti naturali o Lupus Anticoagulant). Un dato interessante di questo studio è che 5 delle 6 donne con la mutazione avevano sviluppato trombosi nel primo trimestre di gravidanza. Due studi ancor più numerosi hanno descritto l'associazione del fattore V di Leiden con tromboembolismo in gravidanza. Bokarewa et al. (*Br J Haematol* 1996; 92: 473) hanno osservato una prevalenza del 46% di portatrici su 74 donne con tromboembolismo venoso, trombosi placentare o stroke, confermando l'osservazione dello studio precedente di una predilezione allo sviluppo di trombosi nel primo trimestre ma anche nel puerperio.

Conclusioni

La mutazione del fattore V di Leiden è la causa più comune di trombofilia ereditaria e fattore predisponente ad aborti spontanei ricorrenti. Studi recenti dimostrano che l'etiopatogenesi risiede in un difetto della fibrinolisi: la resistenza alla Proteina C reattiva. Le manifestazioni cliniche sono legate a trombosi delle arterie spirali uterine con conseguente inadeguata perfusione placentare.

La prevalenza della "Sindrome da fattore V" in Italia è del 3-4% della popolazione, da cui nasce l'esigenza di

dimostrare la correlazione con gli aborti ricorrenti e di proporre test efficaci per la diagnosi. I test da noi utilizzati sono stati: 1) test di screening per individuare la resistenza alla Proteina C reattiva; 2) la PCR.

I due test sono adoperati in modo complementare

per evitare falsi positivi.

Il nostro studio, in linea con la letteratura internazionale, ha dimostrato che le donne positive ai test hanno un minor numero di gravidanze a termine e un maggior numero di aborti.

Bibliografia

1. AARO LA, JUERGENS JL. *Thrombophlebitis associated with pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1971;8:1128-33.
2. ABRAMOVICI H, FAKTOR JH, PASCAL B. *Congenital uterine malformations as indication for cervical suture (cerclage) in habitual abortion and premature delivery*. Int J Fertil 1983;28:161-6.
3. ANCEL PY, SAUREL-CUBIZOLLES MJ, DI RENZO GC, PAPIERNIK E, BREART G. *Risk factors for 14-21 week abortions: a case-control study in Europe. The Europ Group*. Hum Reprod 2000;15:2426-32.
4. BARBOUR LA. *Current concepts of anticoagulation therapy in pregnancy*. Obstet Gynecol Clin North Am 1997;24:499-521.
5. BONNAR J. *Can more be done in obstetric and gynecologic practice to reduce morbidity and mortality associated with venous thromboembolism?* Am J Obstet Gynecol 1999;180:784-91.
6. CHASEN ST, SILVERMAN NS. *Mid-trimester emergent cerclage: a ten year single institution review*. J Perinatol 1998;18:338-42.
7. CROWTHER MA, SPITZER K, JULIAN J, et al. *Pharmacokinetic profile of low molecular weight heparin (Reviparin) in pregnant patients: a prospective cohort study*. Thromb Res 2000;98:133-138.
8. DAHLBACK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ. *Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of cofactor to activated protein C*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993;90:1004-8.
9. DE STEFANO V, FINAZZI G, MANNUCCI PM. *Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndrome and management*. Blood 1996;87:3531-44.
10. DRILL VA, CALHOUN DW. *Oral contraceptives and thromboembolic disease*. JAMA 1968;206:77-84.
11. EBINA Y, YAMADA H, KATO EH, YAMAMOTO R, SAKURAGI N, FUJIMOTO S. *Thromboprophylaxis with low molecular weight heparin in thrombophilia-complicated pregnancy*. J Obstet Gynaecol Res 2002;28(5):251-7.
12. FORESTIER F, DAFFOS F, CAPELLA-PAVLOVSKY M. *Low molecular weight heparin (PK 10169) does not cross the placenta during the second trimester of pregnancy: study by direct blood sampling under ultrasound*. Thromb Res 1984;34:557-560.
13. GIMSBERG JS, KOWALCHUK G, HIRSH J, BRILL-EDWARDS P, BURROWS R, COATES G, WEBBER C. *Heparin effect on bone density*. Thromb Haemost 1990; 64:286-9.
14. GINSBERG JS, KOWALCHUK G, HIRSH J, BRILL-EDWARDS P, BURROWS R. *Heparin therapy during pregnancy. Risks to the fetus and mother*. Arch Inter Med 1989; 149:2233-36.
15. GINSBERG JS, GREER I, HIRSH J. *Use of antithrombotic agents during pregnancy*. Chest 2001;119:122S-31S.
16. GOLDHABER SZ, GRODSTEIN F, STAMPFER MJ, MANSON JE, COLDITZ GA, SPEIZER FE, WILLET WC, HENNEKENS CH. *A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women*. JAMA 1997;277:642-5.
17. GREER IA. *Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues*. Lancet 1999;353:1258-65.
18. GUZMAN ER, PISATOWSKI DM, VINTZILEOS AM, BENITO CW, HANLEY ML, ANANTH CV. *A comparison of ultrasonographically detected cervical changes in response to transfundal pressure, coughing and standing in predicting cervical incompetence*. Am J Obstet Gynecol 1997;177:660-5.
19. HALL JG, PAULI RM, WILSON KM. *Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy*. Am J Med 1980; 68:122-40.
20. HAY PE, LAMONT RE, TAYLOR-ROBINSON D, MORGAN DJ, ISON C, PEARSON J. *Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage*. BMJ 1994;308:295-8.
21. HIBBARD BM, ANDERSON MM, DRIFE JO, et al. *Report on confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom 1991-93*. London: Her Majesty's Stationery Office. 1996.
22. KIERKEGAARD A. *Incidence and diagnosis of deep vein thrombosis associated with pregnancy*. Acta Obstet Gynecol Scand 1983;62:239-43.
23. LINNEBANK M, HOMBERGER A, NOWAK - GOTTU U, KOCH HG. *A common haplotype for 677T thermolabile variant of 5, 10 - methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombophilic patients and controls*. Hum Mutat 2002;20(6): 478.
24. MARTINELLI I, TAIOLI E, CETIN I, MARINONI A, GEROSA S, VILLA MV, et al. *Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss*. N Engl J Med 2000;343:1015-8.
25. MARTINELLI I. *Pros and cons of thrombophilia testing*. Journal of Thromb Haemost 2003;1:410-1.
26. PARULEKAR SG, KIWI R. *Dynamic incompetent cervix uteri: sonographic observations*. J Ultrasound Med 1988;7:481-5.
27. RAI R, REGAN L, HADLEY E, DAVE M, COHEN H. *Second-trimester pregnancy loss is associated with activated C resistance*. Br J Haematol 1996;92:489-90.
28. SALAZAR E, IZAGUIRRE R, VERDEJO J, MUTCHINICK O. *Failure of adjusted doses of subcutaneous heparin to prevent thromboembolic phenomena in pregnant patients with mechanical cardiac valve prostheses*. J Am Coll Cardiol 1996; 27:1698-703.
29. SALAZAR E, ZAJARIAS A, BUTIERREZ N, ITURBE I. *The problem of cardiac valve prostheses, anticoagulants and pregnancy*. Circulation 1984;70:1169-77.
30. WESSELING J, VAN DRIEL D, HEYMANS HSA, ROSENDAAL FR, et al. *Coumarins during pregnancy: long term effects on growth and development of school-age children*. Thromb Haemost 2001;85:609-13.