



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
“TOR VERGATA”**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di ricerca in
Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare

XXI Ciclo

**Ruolo del polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1
nel determinismo degli eventi tromboembolici venosi**

Dottoranda: Antonietta Viola

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Docente Guida: Prof. Claudio Cortese

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

*..... Ogni momento del vostro cammino verso qualcosa
è una piccola conquista, una piccola gloria.....*

(Corradino)

INDICE

Abbreviazioni	1
INTRODUZIONE	2
1. Trombofilia	3
2. Trombofilia ereditaria e acquisita	4
3. Epidemiologia della trombofilia e rischio associato	7
4. Diagnosi di laboratorio	11
4.1 A chi richiedere i test di screening per trombofilia e quali test richiedere	11
5. Linee di guida terapeutiche	14
5.1 Profilassi primaria	14
5.2 Profilassi secondaria	15
5.3 Trattamento degli episodi trombotici acuti	15
6. Inibitore tipo-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1)	16
SCOPO DELLA RICERCA	19
MATERIALI E METODI	21
7. Analisi dei test coagulativi	22
7.1 Principi di analisi	22
7.2 Determinazione quantitativa dell'ATIII	22
7.3 Determinazione quantitativa della proteina C	22
7.4 Determinazione quantitativa della proteina S	23
7.5 Determinazione quantitativa della resistenza alla proteina C attivata	23
7.6 Determinazione del LAC	24

8. Analisi molecolare delle mutazioni	25
9. Popolazione studiata	26
RISULTATI	27
10. Distribuzione delle mutazioni nella popolazione studiata	28
11. Analisi statistica	28
DISCUSSIONE	30
BIBLIOGRAFIA	33
Ringraziamenti	40

ABBREVIAZIONI

aCL:	Anticorpi anticardiolipina
apL:	Anticorpi antifosfolipidi
ATIII:	Antitrombina III
EP:	Embolia polmonare
EPBM:	Eparina a basso peso molecolare
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer
INR:	International Normalized Ratio
PAI-1:	Inibitore tipo-1 dell'attivatore tissutale del plasminogeno
PC:	Proteina C
PCR:	Polymerase chain reaction
PS:	Proteina S
TVP:	Trombosi venosa profonda
t-PA:	Attivatore tissutale del plasminogeno
VTE:	Tromboembolia venosa
MTHFR:	Metilentetraidrofolatoreduccasi
LAC:	Lupus Anticoagulant
LES:	Lupus Eritematoso Sistemico
RR:	Rischio relativo
SK:	Streptochinasi
UK:	Urochinasi

INTRODUZIONE

1. TROMBOFILIA

La trombofilia è la tendenza, determinata da cause congenite o acquisite, al tromboembolismo venoso e/o arterioso.

Tale fenomeno rappresenta, per il versante arterioso, la principale causa di morte nelle società sviluppate mentre per il versante venoso ha un'incidenza annuale dell'1% nelle popolazioni occidentali.

La trombosi venosa profonda (TVP) è una malattia caratterizzata dall'ostruzione, parziale o completa, di una o più vene del circolo profondo degli arti inferiori o superiori (vedi Fig.1); i segni clinici sono rappresentati da rigonfiamento con edema della gamba e/o della coscia, dolore o dolorabilità al polpaccio, aumento della temperatura cutanea, dilatazione delle vene superficiali, cianosi (in caso di ostruzione severa) (vedi Fig.2).

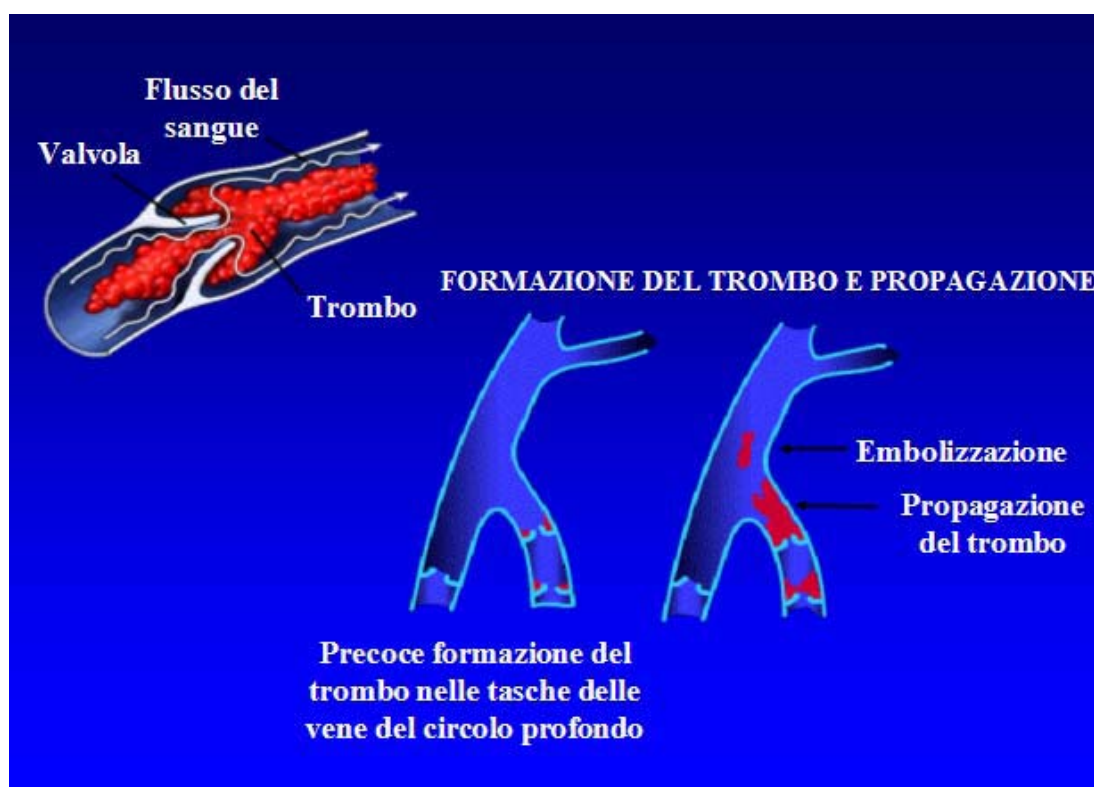


Fig. 1 Meccanismo patogenetico della formazione del trombo



Fig. 2 Segni clinici di TVP

Gli stati di ipercoagulabilità possono essere classificati in ereditari e acquisiti.

2. TROMBOFILIA EREDITARIA E ACQUISITA

La trombofilia ereditaria dipende da difetti che causano una riduzione quantitativa o un deficit qualitativo dei meccanismi anticoagulanti o della fibrinolisi oppure dalla presenza di polimorfismi di alcuni fattori della coagulazione (vedi Tab.1)

<p>Deficit di antitrombina III</p> <p>Deficit di proteina C</p> <p>Deficit di proteina S</p> <p>Resistenza alla proteina C attivata (Fattore V Leiden)</p> <p>Iperprotrombinemia (Fattore II G20210A)</p> <p>Deficit del plasminogeno e dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA)</p> <p>Difetti dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1)</p> <p>Disfibrinogenemia</p> <p>Iperomocisteinemia</p>
--

Tab. 1 Fattori di rischio trombotico ereditari

Una trombofilia su base ereditaria si sospetta in presenza di episodi tromboembolici ricorrenti, esordio in età giovanile, tromboembolia a localizzazione anatomica anomala (vene mesenteriche, vena porta, vene cerebrali), anamnesi familiare positiva.

La trombofilia acquisita riconosce cause molteplici, che agiscono perturbando l'equilibrio emostatico in senso protrombotico: alcune di esse possono essere persistenti nel tempo, come gli anticorpi antifosfolipidi e le patologie croniche di tipo infettivo, infiammatorio, dismetabolico o neoplastico, altre transitorie, come i traumi, gli interventi chirurgici, la gravidanza e il puerperio e l'assunzione di estroprogeninici (vedi Tab.2).

SITUAZIONI ACQUISITE ARTERIOSE	SITUAZIONI ACQUISITE VENOSE
<p>Età: M > 45 aa; F > 55 aa</p> <p>Aterosclerosi</p> <p>Fumo di sigaretta</p> <p>Iperensione</p> <p>Diabete mellito</p> <p>Colesterolo LDL</p> <p>Lipoproteina (a)</p> <p>Ipertrigliceridemia</p> <p>Estroprogestinici</p> <p>Policitemia</p> <p>Sindromi da iperviscosità</p>	<p>Gravidanza e puerperio</p> <p>Trauma</p> <p>Immobilizzazione prolungata</p> <p>Periodo postoperatorio</p> <p>Età avanzata</p> <p>Uso di estroprogestinici</p> <p>Neoplasie maligne</p> <p>Sindromi mieloproliferative croniche</p> <p>Sindrome da anticorpi antifosfolipidi</p>

Tab. 2 Fattori di rischio trombotico acquisiti

Ovviamente è possibile la concorrenza nello stesso individuo di fattori genetici e acquisiti, e questa è l'evenienza più comune, specialmente quando l'evento trombotico si realizza effettivamente. Bisogna infatti sottolineare che l'identificazione di uno stato trombofilico non significa che l'evento trombotico si debba necessariamente verificare: la maggior parte degli individui portatori di uno o più difetti trombofilici sono destinati a rimanere asintomatici nel tempo. Solo in una minoranza di casi si realizzerà una trombosi clinicamente manifesta, spesso come risultato dell'intervento di fattori trombogeni intercorrenti (ad es. un trauma o un intervento chirurgico) su uno stato trombofilico preesistente. Questo significa che l'identificazione di un difetto trombofilico non deve portare automaticamente all'istituzione di una terapia anticoagulante. L'uso di questi farmaci a scopo profilattico primario o secondario, infatti, andrà riservato solo ai soggetti con un difetto trombofilico che hanno una storia personale o familiare di trombosi.

3. EPIDEMIOLOGIA DELLA TROMBOFILIA E RISCHIO ASSOCIATO

L'incidenza annuale di TVP aumenta esponenzialmente con l'età passando da meno di 5 casi /100.000 persone tra i ragazzi al di sotto di 15 anni a 450-600 casi/100.000 persone tra gli individui al di sopra di 80 anni; non c'è, però, una differenza statisticamente significativa tra uomini e donne (Anderson FA et al., 1991; Silverstein MD et al., 1998) (vedi Fig.3).

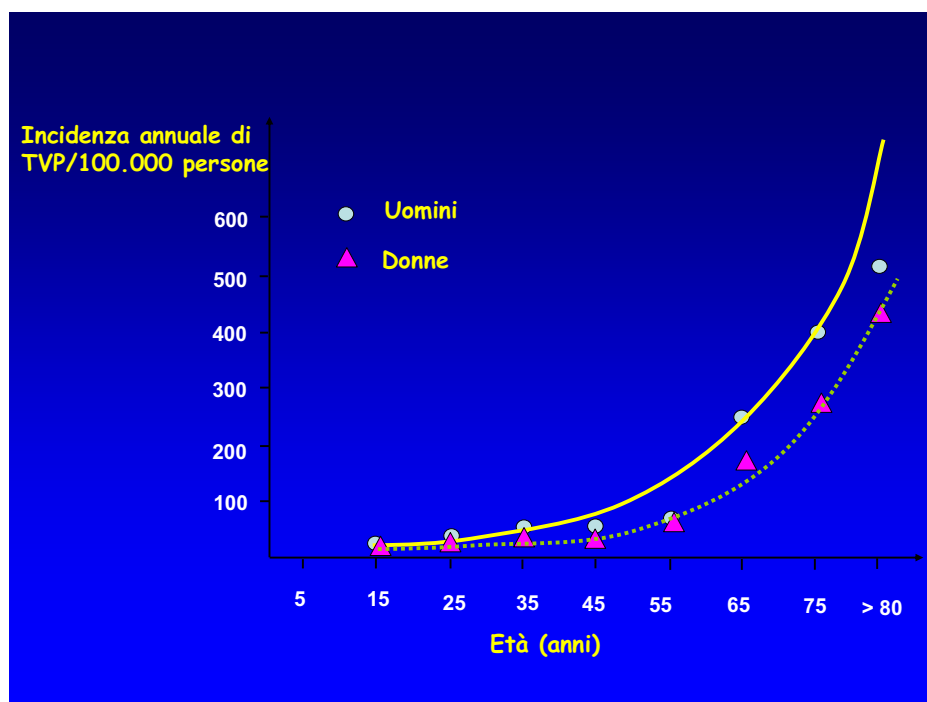


Fig. 3 Incidenza annuale di TVP in relazione a sesso ed età

Per quanto concerne i fattori di rischio ereditari è importante sapere che i deficit degli anticoagulanti naturali (PC, PS e ATIII) sono molto rari, essendo presenti in meno dell'1% della popolazione generale e in meno del 10% dei pazienti non selezionati con trombosi venosa profonda (De Stefano V., et al 1996; Seligsohn U., et al 2001; Tait RC et al.,1994).

Tra i portatori di questi deficit, il rischio di sviluppare una TVP è da 5 a 8 volte più alto rispetto a quello della popolazione generale e l'incidenza annuale di TVP oscilla tra l'1% e il 2% (Martinelli I. et al., 1998; Simioni P et al., 1999; Makris M et al., 2000; De Stefano V et al., 1994; Sanson B-J et al., 1999, van der Meer FJM et al., 1997) (vedi Tab. 3).

Il primo evento trombotico si realizza più frequentemente al di sotto dei 45 anni, in presenza di fattori trombotogeni intercorrenti (es. traumi o interventi chirurgici).

Il fattore V Leiden è molto frequente nella popolazione generale Europea e Nord Americana di origine Caucasica, con un gradiente dal Nord al Sud fra il 10% e il 15% in alcune regioni della Svezia, tra il 2% e il 3% nell'Italia Settentrionale, e fino all'1% nell'Italia Meridionale.

Nei pazienti con tromboembolia venosa (TEV) la prevalenza è del 18% (Rees DC et al., 1996; De Stefano V et al., 1998); questa mutazione, diversamente dalle carenze degli anticoagulanti naturali determina un eccesso di funzione coagulante del fattore V.

Il rischio relativo (RR) di TEV è di 2-7 volte per gli eterozigoti e di 40-80 volte per gli omozigoti; l'incidenza annuale di TEV è 0,19% - 0,67% (vedi Tab.3) (Martinelli I. et al., 1998; Simioni P et al., 1999, Middeldorp S. et al., 1998; Lensen RP et al., 2000; Martinelli I et al., 2000, Simioni P et al., 2002; Meinardi JR et al., 2001).

La protrombina G20210A ha una frequenza nella popolazione generale molto alta (0,3% - 4%), con un gradiente di frequenza geografica che appare inverso a quella del fattore V Leiden (più frequente nel Sud Europa che nel Nord). Anch'essa determina un eccesso di funzione della protrombina ed è presente nel 7% dei pazienti con TEV (Poort SR et al., 1996; Zivelin A et al., 1998, Rosendaal FR et al., 1998; De Stefano V et al., unpublished data). Il RR è di 2-3 volte per gli eterozigoti e l'incidenza annuale di TEV risulta 0,13% - 0,23% (vedi Tab.3) (Poort SR et al., 1996; Martinelli I et al., 2000; De Stefano V et al., unpublished data).

L'iperomocisteinemia costituisce un fattore di rischio importante sia per le trombosi venose che arteriose. Una recente meta-analisi degli studi sugli effetti cardiovascolari dell'omocisteina ha dimostrato che un incremento di 5 μ moli/l dell' omocisteinemia è associato ad un RR di 1,32-1,42 per la cardiopatia ischemica, di 1,59-1,65 per

l'ictus e di 1,60 per la TEV (vedi Tab.3). Fattori acquisiti (introito di vitamine B12, B6 e folati) possono causare iperomocisteinemia in associazione a fattori genetici come il polimorfismo del metilentetraidrofollato-reduttasi (MTHFR) C677T.

La prevalenza del genotipo TT nella popolazione Caucasica è del 13,7% (De Stefano V et al., 2000), molto simile a quella trovata tra i pazienti con TEV (vedi Tab.3).

Gli studi finora effettuati non hanno dimostrato un ruolo importante di questo polimorfismo nel determinismo del rischio tromboembolico.

Anche gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) rappresentano un fattore di rischio per le trombosi (sia arteriose che venose). La prevalenza nella popolazione generale è dell'1% - 5% (vedi Tab.3) (Petri M 2000) e aumenta con l'età. Nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) la prevalenza di lupus anticoagulant (LAC) oscilla tra il 15% e il 34% (Cervera R et al., 1993; Love PE et al., 1990) e la prevalenza dei anticorpi anticardiolipina (aCL) tra il 12% e il 30% (Merkel PA et al., 1996; Cervera R et al., 1993), mentre l'incidenza annuale di trombosi è del 2%.

Evidenze dirette ottenute da studi caso-controllo o da studi familiari, suggeriscono che la presenza simultanea in un individuo di distinti difetti protrombotici aumenta significativamente il rischio di sviluppare fenomeni trombotici e recidive (De Stefano V et al., 1996, Roseendaal FR 1999; Meinardi JR et al., 2001; Mandel H et al., 1996; Salomon O et al., 1999; Emmerich J et al., 2001).

Considerando la prevalenza nella popolazione generale, è relativamente frequente incontrare individui eterozigoti per il fattore V Leiden e per la protrombina G20210A, con una frequenza attesa dello 0,1% ; il RR per questi individui è di 20 volte e l'incidenza annuale di TEV risulta essere dello 0,57% (vedi Tab.3) (Meinardi JR et al., 2001; Emmerich J et al., 2001).

Il rischio di sviluppare trombosi delle vene profonde della gamba nelle donne che assumono contraccettivi orali e che sono portatrici delle sopra citate mutazioni aumenta di 6-10 volte rispetto alle donne che assumono la pillola senza avere un difetto trombofilico; queste a loro volta hanno un rischio trombotico da 4 a 6 volte superiore rispetto a donne che non usano la pillola e che non sono portatrici di alterazioni trombofiliche.

TRATTO TROMBOFILICO	POPOLAZIONE CAUCASICA GENERALE (PREVALENZA %)	PAZIENTI NON SELEZIONATI CON TEV (PREVALENZA %)	PAZIENTI SELEZIONATI CON TEV (PREVALENZA %)	RISCHIO RELATIVO DI TEV	INCIDENZA ANNUALE DI TEV (%)
Deficit di AT	0,02-0,16	1,9	4,3	5	1-2
Deficit di PC	0,2-0,4	3,7	4,8	6,5	1-2
Deficit di PS	0,03-0,13	2,3	4,3	1,7	1-2
Fattore V Leiden	5	18,8	18,1	7 (eterozigoti) 40-80 (omozigoti)	0,19-0,67
PT G20210A	2	7,1	7,3	2-3	0,13-0,23
FV Leiden + PT G20210A	0,01 (attesa)	-	2,2	20	0,57
Iperomocisteinemia	5	13-25	10-25	1,6 (ogni 5 u moli/l)	-
MTHFR C677T	13,7 (TT)	-	13,9	1	-
Antifosfolipidi	1-5	15	-	5	2

Tab. 3 Epidemiologia della trombofilia e rischio trombotico associato

4. DIAGNOSI DI LABORATORIO

Lo scopo dell'indagine di laboratorio è di identificare accuratamente la presenza di uno o più difetti noti per essere causa di trombofilia congenita.

4.1 A chi richiedere i test di screening per trombofilia e quali test richiedere

La malattia tromboembolica venosa, come accennato in precedenza, è una malattia a patogenesi multifattoriale, dove fattori genetici, unitamente a fattori ambientali e comportamentali, sono responsabili della comparsa delle manifestazioni cliniche della malattia.

I soggetti candidati a ricevere lo screening per trombofilia appartengono a diverse categorie. Sono da indagare, infatti, pazienti con tromboembolismo venoso in atto o pregressa storia di tromboembolismo, familiari di pazienti con tromboembolismo venoso in cui sia stato diagnosticato un difetto trombofilico, donne in età fertile che stanno assumendo o dovranno assumere estroprogestinici, oppure in corso di gravidanza/puerperio, pazienti che in età giovanile (< 45 anni) hanno manifestato un evento trombotico arterioso da causa ignota, bambini che hanno sviluppato un evento trombotico venoso oppure un ictus ischemico (vedi Tab.4).

Quando la trombosi venosa compare in età adulta o senile, soprattutto se vi è una causa contingente (intervento chirurgico, tumore, immobilizzazione prolungata, etc...) non è opportuno eseguire l'indagine; in questi casi, infatti, la conoscenza dell'esistenza o meno di una causa congenita di trombofilia non cambia l'approccio terapeutico.

Inoltre, le prove diagnostiche di trombofilia non vanno eseguite in individui sani senza storia personale o familiare di trombosi venosa quando essi siano esposti elettivamente a fattori di rischio trombotici contingenti, come per esempio la gravidanza, la chirurgia ortopedica ad alto rischio e la prolungata immobilizzazione. Lo stesso consiglio di non eseguire le indagini di laboratorio indiscriminatamente vale anche per le donne che assumono i contraccettivi orali e per mutazioni frequenti

nella popolazione generale come quelle del fattore V e della protrombina. La loro ricerca indiscriminata non è infatti giustificata dal rapporto costo-beneficio. Lo studio di laboratorio è invece fortemente raccomandato nei familiari anche asintomatici dei casi già diagnosticati, perché in questo modo possono beneficiare della instaurazione di una profilassi antitrombotica in occasione di esposizione a rischi contingenti di trombosi.

1. Pazienti con TEV:

- a. giovanile (<50 anni)
- b. ricorrente
- c. apparentemente spontanea
- d. in sede insolita (cervello, arti superiori, addome)
- e. con storia familiare di TEV o trombosi arteriosa giovanile
- f. secondaria a gravidanza/puerperio, contraccettivi orali

Sono esclusi i pazienti con prima TEV provocata dopo i 50 anni o TEV associata a cancro

2. Pazienti con trombosi neonatale

3. Pazienti con trombosi arteriosa giovanile (<45 anni) o senza fattori di rischio aterosclerotici

4. Donne con patologia gravidica:

- g. una o più perdite fetali tardive (dopo la 10^a settimana)
- h. due o più perdite fetali precoci (prima della 10^a settimana)
- i. potenzialmente altre complicanze: pre-eclampsia, IUGR, abruptio placentae

5. Soggetti asintomatici familiari di I grado di portatori di un difetto trombofilico noto, previa consulenza e consenso informato

6. Donne asintomatiche con storia familiare di TEV o familiarità per difetto trombofilico noto prima della gravidanza, terapia con contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva

Tab. 4 Indicazioni allo screening per trombofilia

I test di screening devono essere specifici, limitati nel numero e ben correlati al problema clinico (vedi Tab.5).

PT, aPTT, Fibrinogeno, Antitrombina III

Proteina C

Proteina S

Resistenza alla proteina C attivata

LAC e aCL (IgG e IgM)

Omocisteina

Plasminogeno

t-PA

PAI-1 funzionale

Polimorfismo G1691A del fattore V

Polimorfismo C677T dell'MTHFR

Polimorfismo G20210A della protrombina

Polimorfismo 4G/5G del PAI 1

Tab. 5 Test di screening per trombofilia

5. LINEE DI GUIDA TERAPEUTICHE

La terapia delle trombofilie congenite comprende la prevenzione primaria delle manifestazioni cliniche in portatori di difetti ma ancora asintomatici, la prevenzione secondaria delle recidive in portatori dei difetti che hanno già avuto un episodio trombotico e naturalmente la terapia degli episodi trombotici acuti.

5.1 Profilassi primaria

Circa il 30-40% degli individui con difetti degli anticoagulanti naturali non sviluppa mai manifestazioni cliniche nel corso della propria vita. La percentuale di pazienti che rimane senza trombosi è sicuramente più alta per difetti come le mutazioni dei fattori V e II e l'iperomocisteinemia, come risulta chiaramente dall'osservazione di centenari portatori sani della mutazione del fattore V. Inoltre, la durata della vita degli individui con carenza di PC e ATIII non è diversa da quella della popolazione generale; né si può identificare in alcun modo chi è destinato ad avere un episodio trombotico da chi rimarrà asintomatico.

La profilassi a vita con farmaci anticoagulanti non è giustificata nei portatori asintomatici dei difetti trombofilici, sia perché il rischio emorragico legato a questi farmaci è superiore al rischio trombotico, sia per il costo del controllo di laboratorio della terapia.

La profilassi anticoagulante è invece consigliata quando un portatore asintomatico viene esposto a fattori di rischio contingenti e la terapia standard va potenziata qualora l'individuo in esame fosse sottoposto a interventi chirurgici considerati a rischio trombotico particolarmente elevato (chirurgia ortopedica, chirurgia dei tumori).

Vanno considerate situazioni contingenti ad alto rischio trombotico anche la gravidanza e soprattutto il periodo puerperale per almeno quattro settimane dopo il parto, soprattutto nelle pazienti con carenza di antitrombina. Per questi motivi è raccomandata durante tutta la gravidanza la profilassi con eparina sottocutanea con le stesse dosi raccomandate per la chirurgia maggiore a rischio basso o moderato. Nel

puerperio è opportuno potenziare tale terapia, impiegando gli stessi schemi che si consigliano per la chirurgia ortopedica ed oncologica ad alto rischio.

5.2 Profilassi secondaria

Come comportarsi in un paziente che ha già avuto una manifestazione trombotica e in cui è stato riscontrato il difetto trombofilico?

Allo stato attuale non ci sono studi conclusivi atti a dare risposte specifiche per questi pazienti rispetto a quelli senza difetti. Gli esperti raccomandano di eseguire la terapia anticoagulante per 3-6 mesi dopo l'episodio acuto, come del resto si farebbe in pazienti non trombofilici. In gruppi specifici di pazienti considerati a rischio particolarmente elevato, viene raccomandata la terapia anticoagulante a vita. Appartengono senz'altro a questo gruppo coloro che hanno avuto più di un episodio trombotico.

Un discorso a parte, sia in termini di prevenzione primaria che secondaria, va fatto quando viene diagnosticata l'iperomocisteinemia. La somministrazione giornaliera di dosi relativamente basse di acido folico, associato o meno alle altre due vitamine coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina (vitamina B6, vitamina B12), riduce i livelli plasmatici dell'aminoacido, con basso costo e nessun effetto collaterale per il paziente. Le dosi giornaliere raccomandate sono 0.5 mg di acido folico, 0.5 mg di vitamina B12 e 50 mg di piridossina.

5.3 Trattamento degli episodi trombotici acuti

Il trattamento raccomandato del tromboembolismo venoso in fase acuta è lo stesso che viene raccomandato in pazienti con tromboembolismo venoso senza difetti trombofilici.

E' utile iniziare con eparina a basso peso molecolare combinata subito con anticoagulanti orali, sospendendo il primo trattamento quando viene raggiunto il range terapeutico con il secondo.

6. INIBITORE TIPO-1 DELL'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO (PAI-1).

La fibrinolisi è un processo proteolitico attraverso il quale viene dissolta la fibrina. La funzione della fibrinolisi è, da un lato, di riaprire i tratti vasali occlusi, dall'altro di circoscrivere la formazione del coagulo. Tale processo avviene fisiologicamente soltanto laddove è stata prodotta fibrina in precedenza. L'enzima proteolitico protagonista di questa fase è la plasmina; essa deriva dal plasminogeno, la cui attivazione è determinata dall'Attivatore Tissutale del Plasminogeno (t-PA), dall'Urokinasi (UK) e dalla Streptochinasi (SK).

L'equilibrio dinamico del sistema fibrinolitico è garantito dalla presenza degli inibitori fisiologici della fibrinolisi, primo fra tutti l'inibitore dell'Attivatore tissutale del Plasminogeno (PAI-1).

Il PAI-1 è una glicoproteina con P.M. di circa 52 KD appartenente alla famiglia delle serpine; viene sintetizzata dagli epatociti e dalle cellule endoteliali ed è presente sia nelle piastrine che nel plasma.

Il PAI-1 reagisce quasi allo stesso modo con l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) a singola e a doppia catena e con l'urochinasi (uPA) a doppia catena, ma non con l'urochinasi a catena singola.

L'interazione tra il t-PA e il PAI-1 probabilmente determina prima la formazione di un complesso reversibile, che in un secondo momento diventa covalente dopo il clivaggio di un legame peptidico nella molecola del PAI-1.

Sono state identificate tre forme di PAI-1. La forma attiva rappresenta solo una piccola parte del PAI-1 circolante; si trova complessata con la proteina legante il PAI-1, denominata vitronectina. Una maggiore quantità di PAI-1 circola in forma latente, che può essere convertita nella forma attiva dai fosfolipidi. La terza forma è costituita da PAI-1 o complessi t-PA-PAI-1 inattivi; questa forma non può essere convertita in forma attiva.

Il PAI-1 è una proteina della fase acuta e la sua concentrazione plasmatica aumenta in caso di infezioni, in alcuni tumori maligni e nel periodo post-operatorio. Elevati

livelli di PAI-1 sembrerebbero essere associati con la trombosi venosa profonda, l'infarto miocardio e l'arteriopatia coronarica (Nilsson IM, et al., 1985; Wiman B et al., 1985; Juhan-Vague I et al., 1987; Nguyen G et al., 1988; Lane DA et al., 2000).

Il gene del PAI-1, che mappa sul braccio lungo del cromosoma 7 (Strandberg L et al., 1988), presenta numerosi loci polimorfici, tra cui un polimorfismo (CA)*n dinucleotide-repeat* nell'introne 3 del gene (Dawson et al., 1991) ed un polimorfismo inserzione/delezione 4G/5G in posizione -675 dal sito di inizio del promotore (Dawson SJ et al., 1993) (vedi Fig.4)

L'allele 4G può legare solo *enhancers* di trascrizione, mentre il 5G interagisce con *enhancers* e *suppressors*: questo si traduce in un più basso livello di trascrizione in presenza dell'allele 5G. Numerosi studi hanno dimostrato che soggetti omozigoti 4G/4G hanno livelli di PAI-1 più alti del 25% dei soggetti 5G/5G (Ye S, et al., 1995; Eriksson P et al., 1995; Burzotta F et al., 1998; Margaglione M et al., 1997).

L'associazione del genotipo polimorfico con la malattia cardiovascolare è tuttora dibattuta.

Alcuni autori sostengono che il genotipo 4G/4G determina un incremento del rischio di infarto (Bang CO et al., 2001; Wiklund PG et al., 2005), mentre altri supportano un effetto neutrale o addirittura protettivo dello stesso genotipo contro eventi cerebrovascolari (Roset M et al., 2000)

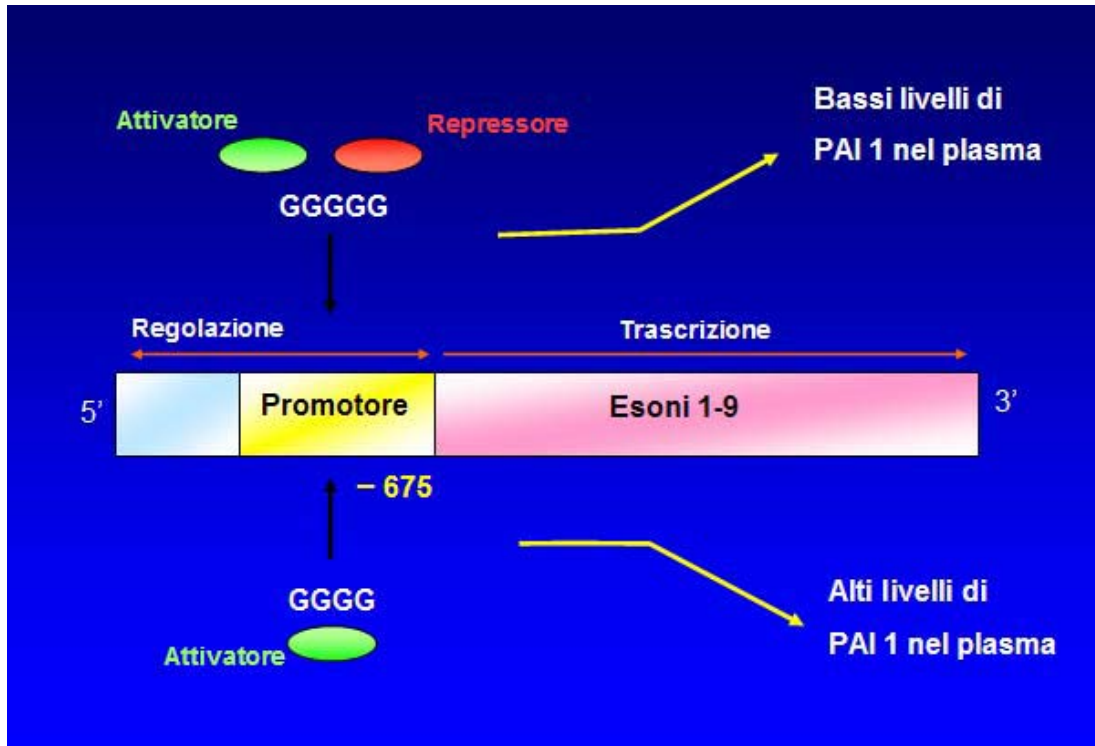


Fig. 4 Struttura del gene PAI-1

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare con quanta forza la presenza del polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1 è in grado di predire il rischio di sviluppare un evento tromboembolico venoso. Questa valutazione è stata effettuata considerando la presenza del polimorfismo sia isolatamente sia in associazione con altre mutazioni che possono influenzare la bilancia emostatica innescando uno stato protrombotico (mutazione G1691A del gene per il fattore V, mutazione G20210A del gene per il fattore II, mutazione C677T del gene per l' MTHFR).

Lo studio è stato condotto su una popolazione costituita da 150 pazienti affetti da trombosi venosa profonda e 192 individui sani selezionati sulla base della loro storia clinica.

Hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro il Centro Emostasi e Trombosi e il laboratorio di Biologia Molecolare Clinica del Policlinico "Tor Vergata" di Roma.

MATERIALI E METODI

7. ANALISI DEI TEST COAGULATIVI

7.1 Principi di analisi

Nel nostro laboratorio i test coagulativi vengono eseguiti mediante il CA-7000 (Sysmex), un sistema automatizzato che impiega metodi coagulativi, cromogenici e immunologici.

7.2 Determinazione quantitativa dell'ATIII

Nel nostro laboratorio viene utilizzato il Kit Spectrolyse Antithrombin Biopool-Trinity (DASIT) per la determinazione quantitativa, con metodo cromogenico, dell'antitrombina III nel plasma umano.

Tale metodica prevede la determinazione dell'AT-III mediante aggiunta di trombina in eccesso al plasma diluito in presenza di eparina.

Dopo un periodo di incubazione iniziale, l'attività trombinica residua non inibita dall'AT-III viene determinata con uno specifico substrato cromogenico.

L'attività della trombina residua è inversamente proporzionale alla concentrazione di AT-III contenuta nel plasma in esame.

7.3 Determinazione quantitativa della proteina C

Nel nostro laboratorio viene utilizzato il Kit Spectrolyse Protein C Biopool-Trinity (DASIT) per la determinazione quantitativa, con metodo cromogenico, della proteina C nel plasma umano.

Tale metodica prevede l'utilizzo di una specifica frazione del veleno di Agkistrodon Contortrix per attivare in modo rapido e selettivo la proteina C.

La proteina C attivata viene quindi dosata monitorando l'idrolisi di uno specifico substrato cromogenico. La quantità di attività amidolitica generata, determinata

misurando l'assorbanza a 405 nm, è direttamente proporzionale alla quantità di proteina C presente nel campione.

7.4 Determinazione quantitativa della proteina S

Nel nostro laboratorio viene utilizzato il Kit Bioclot Protein S-300ACT Biopool-Trinity (DASIT) per la determinazione quantitativa, con metodo coagulativo, della proteina S nel plasma umano.

Il plasma in esame, opportunamente diluito, viene miscelato con plasma depleto di proteina S. La miscela di plasmi viene quindi attivata da un reagente attivatore che contiene fattore Xa, proteina C attivata, fosfolipidi. Dopo cinque minuti di incubazione viene aggiunto calcio cloruro che innesca la reazione di formazione del coagulo. Il prolungamento del tempo di coagulazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina S nel plasma in esame.

7.5 Determinazione quantitativa della resistenza alla proteina C attivata

Nel nostro laboratorio viene utilizzato il Kit Diagen PCA- Ratio Test (DASIT), in combinazione al plasma depleto di fattore V Diagen per la determinazione della resistenza alla proteina C attivata (APC resistance) causata dal fattore V Leiden.

Il plasma depleto di fattore V viene impiegato per diluire il plasma del paziente in esame (con rapporto di diluizione 1:5) in modo da normalizzare i livelli dei fattori vitamina K dipendenti, della via intrinseca, della PC e della PS.

Il plasma del paziente viene analizzato eseguendo in parallelo due test APTT: il primo in presenza di attivatore della PC (PCA.APTT), il secondo in assenza di attivatore della PC (aPTT).

Dopo aver aggiunto CaCl_2 viene registrato il tempo di coagulazione di entrambi i test.

Il risultato deve essere espresso come rapporto (Ratio) tra i due tempi di coagulazione: PCA.APTT/aPTT . Nei soggetti con resistenza alla proteina C attivata il prolungamento del tempo di coagulazione del test PCA.APTT è inferiore a quello dei soggetti normali, fornendo quindi valori di Ratio più bassi.

7.6 Determinazione del LAC

Nel nostro laboratorio vengono utilizzati i sistemi di analisi AMAX ACCUCLOT dRVVT screen e confirm per determinare in modo specifico la presenza del LAC nel plasma umano.

La metodica prevede l'uso del veleno di vipera che svolge la sua azione attivando direttamente il fattore X. L'analisi viene effettuata su campioni ottenuti mescolando il plasma del paziente con un plasma normale in modo da escludere l'effetto dovuto all'eventuale mancanza dei fattori II, V e X. Se il tempo di coagulazione si presenta prolungato anche dopo il mescolamento dei due plasmi, allora si è in presenza di un campione di plasma che contiene LAC o altri inibitori.

In questi casi il sistema dRVVT confirm può essere usato per identificare in modo più specifico la presenza del LAC nel plasma del paziente

8. ANALISI MOLECOLARE DELLE MUTAZIONI

Nel nostro laboratorio la ricerca del polimorfismo 4G/5G nel gene del PAI-1 e delle mutazioni G1691A nel gene del fattore V, G20210A nel gene del fattore II e C677T nel gene dell'MTHFR, viene effettuata mediante l'utilizzo del Light Cycler (Roche). Il sistema si basa sull'utilizzo di due sonde oligonucleotidiche specifiche, complementari ad una sequenza interna del frammento amplificato, che vengono incluse nella mix di amplificazione. Una sonda è marcata all'estremità 5' con un fluoroforo LightCycler Red, mentre l'altra sonda è marcata all'estremità 3' con la fluoresceina. Solo dopo ibridizzazione, le due sonde si trovano molto vicine determinando "*Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*" tra i due fluorofori.

La fluoresceina del fluoroforo donatore è eccitata dalla fonte di luce dello strumento. Una parte dell'energia di eccitazione viene trasferita al fluoroforo Red; la fluorescenza emessa viene misurata alla rispettiva lunghezza ed è proporzionale alla quantità delle sequenze specifiche bersaglio presenti nella mix di amplificazione.

Questo strumento consente di eseguire una *polymerase chain reaction (PCR)* rapida in meno di trenta minuti e di quantificare e analizzare i risultati monitorando la produzione di fluorescenza durante l'amplificazione. L'analisi della curva di dissociazione consente un'impensabile velocità nel rilevamento delle mutazioni e nella caratterizzazione degli amplificati.

L'utilizzo del LightCycler minimizza anche il rischio di contaminazione in quanto amplificazione e rilevamento avvengono nella stessa provetta chiusa.

9. POPOLAZIONE STUDIATA

La popolazione oggetto di studio è costituita da 150 pazienti affetti da trombosi venosa profonda (61 maschi e 89 femmine, età media 52 ± 17) afferenti al Centro Emostasi e Trombosi del Policlinico “Tor Vergata” di Roma.

Tali pazienti presentano embolia polmonare o TVP degli arti inferiori secondaria a interventi chirurgici, prolungata immobilità o all’assunzione di contraccettivi orali.

Il gruppo di controllo è costituito da 192 individui sani (76 maschi e 116 femmine età media 51 ± 17), selezionati sulla base della loro storia clinica; si tratta di soggetti che non fanno uso di farmaci, che non presentano malattie cardiovascolari, epatiche e renali e che mostrano analisi cliniche nella norma.

RISULTATI

10. DISTRIBUZIONE DELLE MUTAZIONI NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

Dal nostro studio è emerso che la mutazione G1691A del fattore V è presente, allo stato eterozigote, in 32 pazienti (21,33%) e 20 controlli sani (10,42%), mentre la mutazione G20210A del fattore II è presente, allo stato eterozigote, in 25 pazienti (16,66%) e in 11 controlli sani (5,73%).

La mutazione C677T dell' MTHFR è presente, allo stato eterozigote, in 64 pazienti (42,66%) e 96 controlli sani (64%), ma nessuno dei pazienti e dei controlli presenta elevati livelli di omocisteina.

Per il polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1, infine, è emerso che 35 pazienti (23,33%) e 61 controlli sani (31,77%) presentano il genotipo 4G/4G, 42 pazienti (28%) e 40 controlli sani (20,83%) presentano il genotipo 4G/5G, 74 pazienti (49,33%) e 91 controlli sani (47,39%) presentano il genotipo 5G/5G.

11. ANALISI STATISTICA

Sulla base dei risultati ottenuti è stata effettuata un'analisi di regressione logistica multipla al fine di valutare con quanta forza la presenza di ciascuna delle sopra citate mutazioni è in grado di predire il rischio di sviluppare un evento tromboembolico venoso.

La trombosi venosa è stata considerata come variabile dipendente, mentre sesso, età, mutazione G1691A del fattore V, mutazione G20210A del fattore II, mutazione C677T dell'MTHFR e polimorfismo 4G/5G del PAI-1, sono state considerate come variabili indipendenti; in tal modo è stato possibile determinare, per ciascuna di queste variabili, l' Odds Ratio (OR) associato al verificarsi dell'evento tromboembolico.

Da quest'analisi è emerso che la presenza della mutazione G1691A del fattore V aumenta di 2,2 volte il rischio di sviluppare eventi tromboembolici (95% CI 1,25 –

4,12 P = 0,002), mentre in presenza della mutazione G20210A del fattore II il rischio aumenta di 3,2 volte (95% CI 1,48 – 6,85 P = 0,004).

Quando la mutazione G20210A del fattore II è presente insieme alla mutazione G1691A del fattoreV, l'Odds Ratio diventa di 9,9 (95% CI 1,17 – 83,6 P < 0,0001) (vedi Tab.6). L'elevato CI è conseguenza di un basso numero di pazienti.

Non esiste, invece, un'associazione statisticamente significativa tra il polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1 e la trombosi venosa profonda; questo sia considerando il polimorfismo isolatamente e sia in associazione con le mutazioni sopra citate.

VARIABILE	ODDS RATIO (OR)	P VALUE	95% C.I.
MUTAZIONE G1691A DEL FATTORE V	2,2	0,002	1,25 – 4,12
MUTAZIONE G20210A DEL FATTORE II	3,2	0,004	1,48 – 6,85
MUTAZIONE G 20210A DEL FATTORE II + MUTAZIONE G1691A DEL FATTORE V	9,8	< 0,0001	1,17 – 83,6

Tab. 6 Regressione logistica multipla (TVP variabile dipendente)

DISCUSSIONE

Il PAI-1 è un inibitore del processo fibrinolitico in quanto inibisce l'attivatore tissutale del plasminogeno.

Elevati livelli di PAI-1 nel plasma, pertanto, potrebbero influenzare la bilancia emostatica innescando uno stato protrombotico.

Il gene del PAI-1, che mappa sul braccio lungo del cromosoma 7, presenta numerosi loci polimorfici, tra cui un polimorfismo inserzione/delezione 4G/5G in posizione -675 dal sito di inizio del promotore.

L'allele 4G può legare solo *enhancers* di trascrizione, mentre il 5G interagisce con *enhancers* e *suppressors*: questo si traduce in un più basso livello di trascrizione in presenza dell'allele 5G. Numerosi studi hanno dimostrato che soggetti omozigoti 4G/4G hanno livelli di PAI-1 più alti del 25% dei soggetti 5G/5G.

L'associazione del genotipo polimorfico con la malattia cardiovascolare, tuttavia, è ancora dibattuta.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare con quanta forza la presenza del polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1 è in grado di predire il rischio di sviluppare un evento tromboembolico venoso. Questa valutazione è stata effettuata sia considerando la presenza del polimorfismo isolatamente sia in associazione con altre mutazioni che possono influenzare la bilancia emostatica innescando uno stato protrombotico (mutazione G1691A del fattore V, mutazione G20210A del fattore II, mutazione C677T dell'MTHFR).

Dai risultati ottenuti è emerso che la presenza della mutazione G1691A del fattore V aumenta di 2,2 volte il rischio di sviluppare eventi tromboembolici (95% CI 1,25 – 4,12 P = 0,002), mentre in presenza della mutazione G20210A del fattore II il rischio aumenta di 3,2 volte (95% CI 1,48 – 6,85 P = 0,004).

Quando la mutazione G20210A del fattore II è presente insieme alla mutazione G1691A del fattore V, l'Odds Ratio diventa di 9,9 (95% CI 1,17 – 83,6 P < 0,0001).

L'elevato CI è conseguenza di un basso numero di pazienti.

Si deduce quindi che la presenza simultanea in un individuo di questi due difetti protrombotici aumenta significativamente il rischio di sviluppare fenomeni trombotici.

Non esiste, invece, un'associazione statisticamente significativa tra il polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1 e la trombosi venosa profonda; questo sia considerando il polimorfismo isolatamente e sia in associazione con le mutazioni sopra citate.

Allo stato attuale sarebbe auspicabile uno studio multicentrico randomizzato per poter meglio valutare l'impatto del PAI-1 sullo sviluppo di eventi tromboembolici venosi.

Secondo la nostra esperienza, quindi, il PAI-1 non è in grado di aggiungere significativamente valore predittivo al rischio trombofilico.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson FA Jr**, Wheeler HB, Goldberg RJ, et al. 1991
A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study
Arch Inter Med. 151: 933-93
- Bang CO**, Park HK, Ahn MY, Hwang KY, Hong SY, et al. 2001
4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke.
Cerebrovasc Dis. 11:294-9
- Burzotta F**, Di Castnuovo A, Amore A et al., 1998
4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene –environment interaction.
Thromb Haemost 79: 354-358
- Cervera R**, Khamashta MA, Font J et al., 1993
Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients
Medicine (Baltimore) 72: 113-124
- Dawson S**, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S 1991
Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasminogen activator inhibitor-1 activity
Arterioscler Thromb 11: 183
- Dawson SJ**, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S 1991
The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells
J Biol Chem 268: 10,739
- De Stefano V**, Finazzi G, Mannucci PM 1996
Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management
Blood 87: 3531-3544
- De Stefano V**, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G 1998
Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications
Sem Thromb Haemost 24: 367-379
- De Stefano V**, Rossi E, Paciaroni K, Cina G, Marchitelli E, Pepe R, et al., unpublished data
Different circumstances of the first deep venous thrombosis among young or elder heterozygous carriers of the G20210A mutation in the prothrombin gene
- De Stefano V**, Leone G, Mastrangelo S, Tripodi A, Rodeghiero F, Castaman G, et al., 1994

Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S.

Thromb Haemost 72: 352-358

De Stefano V, Caroselli I, Rossi E, Zappacosta B, Leone G 2000

Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism

Sem Thromb Haemost 26: 305-311

Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, et al., 2001

Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism: pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism.

Thromb Haemost 86: 809-816

Eriksson P, Kallin Bm van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A 1995

Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction.

Proc Natl Acad Sci U S A 92: 1851-1855

Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC et al., 1987

Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep vein thrombosis.

Thromb Haemost 57: 67-72

Lane DA, Grant PJ 2000

Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease.

Blood 95: 1517-1532

Lensen RP, Bertina RM, de Ronde H, Vandenbroucke JP, Rosendaal Fr 2000

Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with factor V Leiden

Haemost 83: 817-821

Love PE, Santoro SA 1990

Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non SLE disorders: prevalence and clinical significance

Ann Intern Med 112: 682-698

Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C et al., 1996

Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden. Effects on thrombosis

N Engl J Med 334: 763-768

Makris M, Leach M, Beachamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, et al., 2000
Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S
Blood 95: 1935-1941

Margaglione M, Grandone E, Vecchione G et al., 1997
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 2082-2087

Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM 2000
The risk of venous thromboembolism in family members with mutation in the genes of factor V or prothrombin or both
Br J Haematol 111: 1223-1229

Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F et al., 1998
Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families
Blood 92: 2353-2358

Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, et al., 2001
Risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden with a concomitant inherited thrombophilic defect: a retrospective analysis
Blood Coag Fibrinol 12: 713-720

Merkel PA, Chang YC, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polisson RP 1996
The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases
Am J Med 101:576-583

Middeldorp S, Henkens CM, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak KH, van der Meer Jet al., 1998
The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis
Ann Intern Med 128: 15-20

Nguyen G, Horellou MH, Kruithof EKO, et al., 1988
Residual plasminogen activator inhibitor activity after venous stasis as a criterion for hypofibrinolysis: a study in 83 patients with confirmed deep vein thrombosis
Blood 72: 601-605

Nilsson IM, Ljungner H, Tengborn L 1985

Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator increased concentration of plasminogen activator inhibitor.

BMJ 290: 1453-1456

Petri M 2000

Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome

J Autoimmun 15: 145-151

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM 1996

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 88: 3698-3703

Rees DC, 1996

The population genetics of factor V Leiden (Arg 506 Gln)

Br J Haematol 95: 579-586

Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS et al., 1998

Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant

Thromb Haemost 79: 706-708

Roset M, Van Der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, De Groot PG, Sixma JJ, et al., 2000

Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women

Circulation 101: 67-70

Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, et al., 1999

Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment

Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 511-518

Sanson B-J, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich PW, Huisman MV, et al., 1999

The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C or protein S: a prospective cohort study.

Blood 94: 3702-3706

Seligsohn U, Lubetsky A 2001

Genetic susceptibility to venous thrombosis.

N Engl J Med 344: 1222-1231

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, et al 1998

Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population based study.

Arch Intern Med. 158: 585-593

Simioni P, Sanson B-J, Prandoni P, Tormene D, Friederich PW, Girolami B, et al., 1999

Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia.

Thromb Haemost 81: 198-202

Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbini P, Gavasso S, Cefalo P, et al., 2002

Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study

Blood 99: 1938-1942

Strandberg L, Lawrence D, Ny T 1988

The organization of the human plasminogen-activator inhibitor family

Eur J Biochem 176: 609-616

Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam SIAM, Daly ME, McCall F et al., 1994

Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population.

Br J Haematol 87: 106-112

Tripodi A, Mannucci PM 2001

Laboratory investigation of thrombophilia

Clin Chem 47: 1597-1606

Wiman B, Ljungberg B, Chmielewskaj et al., 1985

The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis

J Lab Clin Med 105: 265-270

Wiklund PG, Nilsson L, Nilsson AS, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, et al., 2005

Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke. Replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts

Stroke 36: 1661-5

van der Meer FJM, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR 1997

The Leiden Thrombophilia Study (LETS).

Thromb Haemost 78: 631-635

Ye S, Green FR, Scarabin PY et al., 1995

The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1c activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study.

Thromb Haemost 74: 837-841

Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, et al 1998
A single genetic origin for the common prothrombotic G20210 A polymorphism in the
prothrombin gene
Blood 92: 1119-1124

Desidero ringraziare il Prof. Giorgio Federici e il Prof. Claudio Cortese per avermi fornito l'opportunità di frequentare il Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare e la possibilità di svolgere, in questi anni, la mia attività presso i laboratori del Policlinico "Tor Vergata". I loro assidui consigli si sono rivelati preziosi per la mia crescita umana e professionale.