



Università degli Studi di Padova

Scuola di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Medicina

TESI DI LAUREA

Caratterizzazione clinica e genetica di una nuova
famiglia portatrice della duplicazione Factor VIII (F8)
Padua: descrizione di un caso familiare e revisione
della letteratura

Relatore:

Prof. Paolo Simioni

Correlatore:

Prof.ssa Elena Campello

Laureando:

Marco Costanzo

Anno Accademico 2025/2026

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Emostasi	1
1.1.1	Fisiologia dell'emostasi	1
1.1.2	Cascata coagulativa	2
1.1.3	Arresto della coagulazione	8
1.2	Trombofilia	12
1.2.1	Definizione ed epidemiologia	12
1.2.2	Triade di Virchow	14
1.2.3	Tromboembolismo venoso	14
1.2.4	Forme acquisite	15
1.2.5	Forme congenite	28
2	Fattore VIII	44
2.1	Caratteristiche genetiche	44
2.1.1	Sequenza genica	44
2.1.2	Struttura genica	45
2.2	Struttura tridimensionale e funzione	47
2.2.1	Domini proteici	47
2.2.2	Cinetica del FVIII	53

3	Scopo dello studio	63
4	Materiali e metodi	66
4.1	Disegno dello studio	66
4.2	Popolazione dello studio	66
4.3	Prelievi e test coagulativi	67
4.4	Tromboelastometria rotazionale	68
4.5	Ricerca della mutazione <i>F8</i> Padova	68
4.6	Analisi di segregazione familiare della variante di <i>F8</i>	72
4.7	Revisione della letteratura sulle varianti di <i>F8</i> associate a trombofilia	72
4.8	Analisi statistica	73
5	Risultati	74
5.1	Descrizione della famiglia	74
5.1.1	Storia clinica e risultati di laboratorio	74
5.2	Indagini genetiche	106
5.3	Sintesi dei risultati dello studio familiare	112
5.4	Risultati della ricerca bibliografica	117
5.4.1	Livelli elevati di FVIII come fattore di rischio indipen- dente per il TEV	117
5.4.2	Fattore VIII Padova	118
5.4.3	Fattore VIII Aurora	122
5.4.4	Confronto delle famiglie con mutazioni protrombotiche del FVIII	127
5.4.5	Modello predittivo dell'età di esordio	132
6	Discussione	135
6.1	Sintesi del lavoro svolto	135

6.2	Il contributo genetico: una terza famiglia per un meccanismo molecolare ancora raro in letteratura	136
6.3	Il fenotipo biochimico e funzionale	139
6.4	Il fenotipo clinico e la penetranza: un genotipo necessario ma non sufficiente	140
6.5	Confronto con la letteratura e originalità del contributo	141
6.6	Limiti dello studio	142
6.7	Implicazioni cliniche pratiche	143
6.8	Prospettive di ricerca future	145
6.9	Conclusioni	147

Introduzione

1.1 Emostasi

1.1.1 Fisiologia dell'emostasi

L'emostasi rappresenta un processo fisiologico finemente regolato, mediato dall'endotelio, dalle piastrine e dai fattori della coagulazione in corrispondenza della sede di lesione vascolare, che culmina nella formazione di un coagulo con lo scopo finale di arrestare l'emorragia. Essa si sviluppa attraverso una sequenza definita di eventi, illustrata nella Figura 1.1 [1].

1. *Vasocostrizione arteriolare*: grazie all'azione del meccanismo miogenico indotto dalla distensione delle fibre muscolari e a quella del sistema nervoso ortosimpatico, il flusso all'area danneggiata viene ridotto drasticamente [1]; a questa fase possono apportare contributo anche vasocostrittori biochimici rilasciati dalle cellule endoteliali danneggiate (*endothelium-derived contracting factors, EDCFs*), come endotelina-1, prostanoidei e derivati, tra cui di maggiore rilevanza prostaglandina $F2\alpha$ e trombassano A1 [2].

2. *Emostasi primaria*: la distruzione dell'endotelio espone il fattore di

von Willebrand (vWF) e il collagene, che promuovono l'adesione e l'attivazione piastriniche, caratterizzate in primo luogo dal cambiamento di forma da dischi rotondeggianti a corpuscoli piatti e stellati che incrementa la superficie totale, e in secondo luogo dalla secrezione di granuli funzionali alla propagazione del processo; si forma così il tappo piastrinico [1].

3. *Emostasi secondaria*: il plasma entra a contatto con il fattore tissutale (TF), glicoproteina di membrana espressa da fibroblasti e cellule muscolari lisce sub-endoteliali che lega il fattore VII attivando la via estrinseca della coagulazione, portando alla formazione prima di trombina e poi di fibrina, che stabilizza quest'ultima il tappo piastrinico [1].
4. *Stabilizzazione del coagulo*: l'agglomerato così formato inizia un processo di contrazione che ne permette consolidazione e stabilizzazione; localmente, si attivano al contempo fattori anticoagulanti (come l'attivatore tissutale del plasminogeno, tPA) per limitare la coagulazione al sito lesionato e permettere nel tempo il riassorbimento del coagulo e la riparazione tissutale [1].

1.1.2 Cascata coagulativa

La cascata coagulativa è una serie di reazioni enzimatiche che portano alla deposizione di un coagulo insolubile di fibrina. Ogni reazione prevede un enzima (un fattore attivato), un substrato (un fattore in forma inattiva) e un cofattore (che abbassa l'energia di attivazione accelerando la reazione). Questi componenti vengono assemblati sulla superficie fosfolipidica di membrana delle piastrine, carica negativamente. L'assemblaggio dei complessi di

reazione richiede anche lo ione calcio, che lega i residui di acido glutammico γ -carbossilato sfruttando la vitamina K da cofattore. Storicamente, la cascata coagulativa viene suddivisa in due vie distinte: la via intrinseca e la via estrinseca. Questa divisione ha un'origine *in vitro* e una fine didattica.

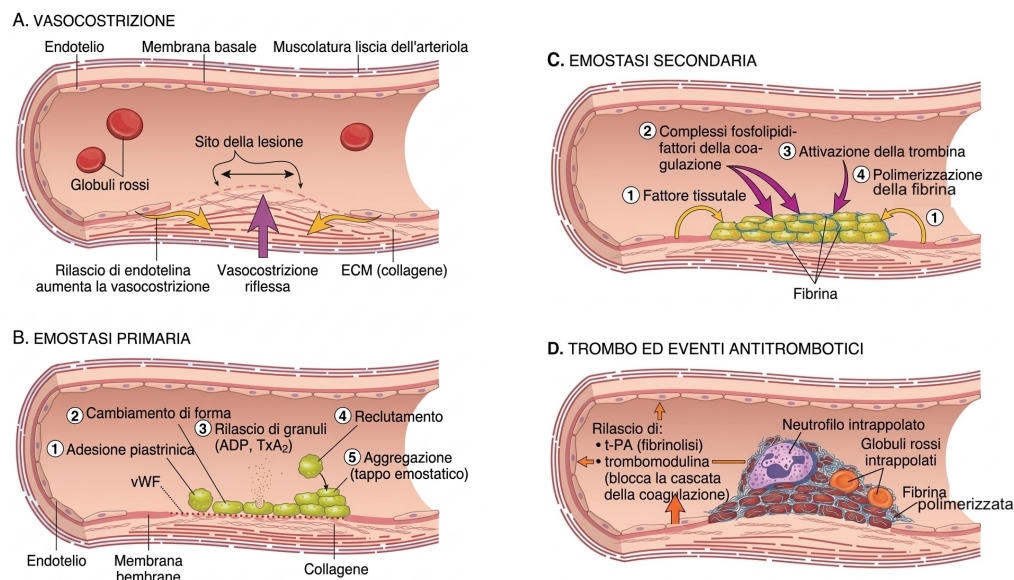


Figura 1.1: Fasi dell'emostasi normale [1].

- Per studiare i meccanismi e le dinamiche di attivazione dei fattori della coagulazione, sono stati sviluppati due differenti saggi: il tempo di protrombina (PT) e il tempo di tromboplastina parziale (PTT). Il PT indaga la funzionalità della via estrinseca tramite aggiunta di TF, calcio e fosfolipidi al plasma e misurando il tempo necessario alla formazione di un coagulo di fibrina. Il PTT indaga invece il tempo di formazione del coagulo di fibrina attraverso la via intrinseca della coagulazione, tramite l'azione procoagulante di particelle negativamente cariche come vetro smerigliato (sempre insieme a calcio e fosfolipidi).

- La distinzione delle due vie permette di comprendere meglio le singole interazioni tra fattori e i meccanismi fisiopatologici delle malattie coinvolte in alterazioni della coagulazione, sia a fini didattici sia a fini diagnostici.

Nonostante questa schematizzazione, il meccanismo *in vivo* si comporta diversamente: in base agli effetti delle deficienze dei singoli fattori negli esseri umani, si ritiene che il complesso formato da fattore VIIa e TF sia il principale responsabile dell'attivazione del fattore IX, e che il complesso fattore IXa e fattore VIIIa sia il principale attivatore del fattore X, come mostrato dalla Figura 1.2.

Inizio della coagulazione

L'innesco della cascata coagulativa richiede l'azione sinergica di molteplici elementi biologici. Affinché le proteine della coagulazione possano ancorarsi efficacemente, è essenziale che piastrine, cellule endoteliali e leucociti vengano preventivamente stimolati così da allestire una superficie di supporto idonea. La concentrazione e la disposizione ravvicinata dei fattori della coagulazione su tale matrice cellulare rappresentano condizioni indispensabili per consentire la progressiva attivazione sequenziale dei diversi zimogeni, avviando il processo coagulativo vero e proprio [3]. Il principale stimolo biologico in grado di far partire questa risposta è storicamente individuato nel danno a carico del microambiente vascolare, che può derivare da sollecitazioni di natura meccanica, chimica o elettrica. Tale insulto provoca la tempestiva attivazione del rivestimento endoteliale, determinando il trasferimento della P-selettina dalle sue sedi di deposito intracellulari (i corpi di Weibel-Palade) alla membrana plasmatica. Allo stesso tempo, la lesione vascolare stimola la componente piastrinica, inducendo l'espressione in superficie della P-selettina

contenuta negli α -granuli. Questa molecola di adesione si lega in modo specifico al suo recettore, il ligando glicoproteico della P-selettina-1 (PSGL-1), capillarmente distribuito sulle membrane dei leucociti (in particolare monociti e neutrofil) [3]. L'interazione P-selettina/PSGL-1 media il rotolamento (*rolling*) di piastrine e leucociti sull'endotelio attivato, un meccanismo fondamentale per delimitare la zona di formazione del trombo. Tale legame si realizza prevalentemente in domini di membrana specifici, noti come microdomini o zattere lipidiche (*lipid rafts*), dove promuove la comparsa di estroflessioni superficiali (*blebs*). Queste strutture, al cui interno si estende la rete actinica del citoscheletro, finiscono per distaccarsi dalla cellula parentale sotto forma di microparticelle. Poiché espongono contemporaneamente sia il TF che PSGL-1, tali microparticelle possiedono un marcato potere trombogenico [3]. Contestualmente alla P-selettina, dai corpi di Weibel-Palade e dagli α -granuli viene rilasciata un'ulteriore proteina chiave: il fattore di von Willebrand (vWF). Nelle regioni vascolari caratterizzate da elevate forze di stress emodinamico (*high shear stress*), come il letto arterioso, il vWF va incontro a una modificazione conformazionale che gli consente di aderire sia alla glicoproteina piastrinica Ib-alfa (GPIb α) sia alla matrice sottoendoteliale messa a nudo dal danno, favorendo l'adesione delle piastrine nel punto di lesione. Al contrario, nei vasi venosi – soggetti a basso stress emodinamico (*low shear stress*) – il vWF secreto dalle cellule endoteliali attivate agisce incrementando il reclutamento piastrinico in prossimità della parete. Inoltre, interagendo con il complesso piastrinico GPIIb/IIIa, il vWF promuove l'aggregazione tra le piastrine stesse. La formazione di questi aggregati misti tra piastrine e leucociti sulla parete danneggiata crea una nicchia microambientale protetta, ideale affinché il TF presente sulle microparticelle possa guidare le successive reazioni enzimatiche volte alla generazione di fibrina

[3].

Il TF è una proteina transmembrana di 47 kDa dotata di un'elevata affinità per il fattore VII. L'associazione nel complesso TF-VII favorisce la conversione di quest'ultimo nella sua forma attiva (fattore VIIa), incrementandone drasticamente la capacità catalitica. Il complesso binario così formato è in grado di attivare sia il fattore IX (in IXa) sia il fattore X (in Xa) tramite taglio proteolitico. Le microvescicole portatrici del complesso TF-VIIa si associano alla membrana delle piastrine attivate e si fondono con essa, potenziandone l'attività proteolitica *in situ*. Nel contempo, il fattore X legato al recettore EPR-1 (*effector cell protease receptor-1*) piastrinico viene clivato dal fattore VIIa e trasformato in fattore Xa. Quest'ultimo attiva il fattore V, precedentemente secreto dagli α -granuli e localizzato sulla superficie piastrinica. In ultima analisi, la protrombina, ancorata alla glicoproteina IIb/IIIa piastrinica, viene convertita in trombina ad opera del fattore Xa, all'interno di una reazione enzimatica che richiede la presenza del fattore Va e degli ioni calcio come cofattori indispensabili. Vale la pena evidenziare che, durante questa fase iniziale di innesco, il percorso descritto porta alla sintesi di sole piccole quantità di trombina; la produzione massiva dell'enzima, necessaria alla stabilizzazione finale del coagulo, avverrà esclusivamente nella successiva fase di amplificazione [3].

Fase di amplificazione

Le esigue quantità di trombina generate durante l'iniziale fase di innesco alimentano un meccanismo a *feedback* positivo, potenziando l'attivazione di piastrine, fattore V e fattore XI. Quest'ultimo, ancorato al complesso glicoproteico Ib/IX sulla membrana delle piastrine attivate, viene clivato dalla trombina nella sua variante funzionale (XIa), la quale provvede a sua volta a

convertire il fattore IX nella sua forma attiva. Contestualmente, anche la frazione di fattore IXa precedentemente originata dal complesso TF-VIIa migra verso la superficie piastrinica attivata, legandosi alla relativa membrana. Come menzionato in precedenza, il vWF condivide con il fattore XI il medesimo sito di ancoraggio sulla glicoproteina Ib/IX piastrinica. Nel circolo ematico, il vWF viaggia stabilmente legato al fattore VIII; l'intervento della trombina ne provoca tuttavia la dissociazione dal vWF, promuovendone al contempo la conversione in fattore VIIIa. Sulla membrana della piastrina, il fattore VIIIa si assembla direttamente con il fattore IXa: la formazione di questo complesso macromolecolare, assistita dagli ioni calcio, catalizza l'attivazione di ulteriori molecole di fattore X. Questa sequenza di eventi biochimici segna la transizione decisiva verso la fase di propagazione del processo coagulativo [3].

Fase di propagazione

La formazione del «complesso tenasi» sulla superficie della membrana piastrinica – formato dall'unione dei fattori VIIIa e IXa in presenza di ioni calcio – innesca una generazione massima di fattore Xa. Quest'ultimo, interagendo con il fattore Va e gli ioni calcio, va a costituire la struttura macromolecolare denominata «protrombinasi», principale responsabile della massiccia produzione (*burst*) di trombina, essenziale per la conversione del fibrinogeno in fibrina. Inoltre, la trombina alimenta un circuito a *feedback* positivo attraverso la stimolazione piastrinica e l'attivazione dei fattori V, VIII e XI, accelerando così in modo autogeno la propria sintesi. Negli stadi finali dell'emostasi, la trombina catalizza la trasformazione del fattore XIII nella sua variante attiva, assicurando il consolidamento e la stabilità meccanica della rete di fibrina, e al contempo induce l'inibitore della fibrinolisi attivabile dal-

la trombina (TAFI), figura chiave nella regolazione del processo fibrinolitico [3].

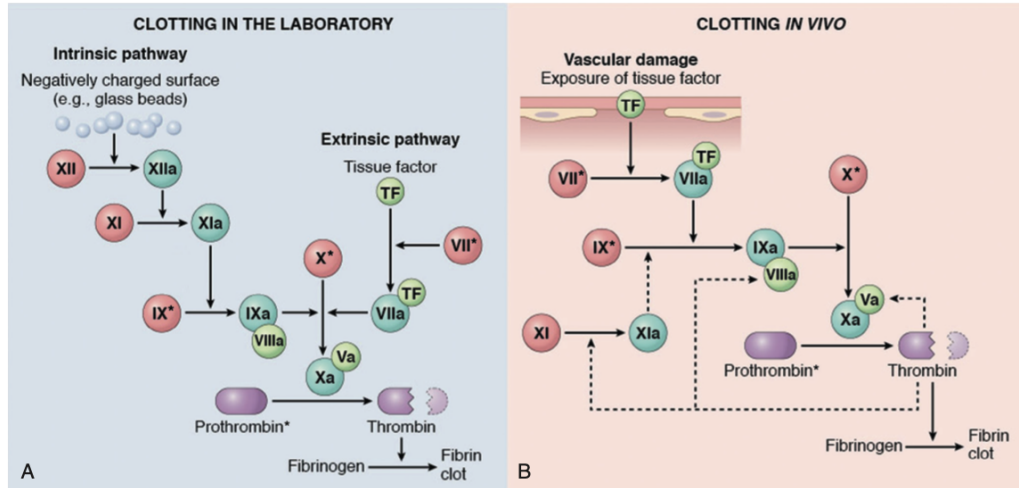


Figura 1.2: Coagulazione *in vitro* a sinistra a confronto con il probabile meccanismo *in vivo* a destra. [1]

1.1.3 Arresto della coagulazione

Una volta avviato, il processo di coagulazione deve rimanere strettamente circoscritto alla sola zona di danno vascolare, così da scongiurare la comparsa di complicanze sistemiche indesiderate. Un primo meccanismo di contenimento è rappresentato dal semplice effetto di diluizione operato dal flusso sanguigno: la corrente ematica che perfolle la breccia vasale diluisce i fattori della coagulazione attivati, i quali vengono successivamente captati e catabolizzati a livello epatico. Un ulteriore elemento limitante è dato dalla disponibilità di fosfolipidi con carica negativa (anionici) che, come indicato in precedenza, vengono esternalizzati sulla membrana prevalentemente dalle piastrine attivate a seguito del loro contatto con la matrice sottoendoteliale nel sito di lesione. Ciò premesso, i sistemi di regolazione di maggiore rilevanza si

basano su mediatori biochimici sintetizzati ed espressi dalle cellule dell'endotelio integro adiacente. L'attivazione della cascata coagulativa promuove contestualmente l'innescò della via fibrinolitica, la cui funzione è quella di delimitare l'espansione del trombo e guidarne la successiva risoluzione. La fibrinolisi è catalizzata principalmente dalla plasmina, un enzima proteolitico capace di clivare la rete di fibrina e di impedirne la polimerizzazione. Il riscontro di elevati livelli ematici dei prodotti di degradazione del fibrinogeno (noti anche come frammenti di scissione della fibrina) – con particolare riferimento ai D-dimeri originati dalla fibrina stabilizzata tramite legami crociati (*cross-linked*) – costituisce un biomarcatore clinico di primaria importanza per la diagnosi delle patologie trombotiche. La plasmina trae origine dal taglio proteolitico del suo zimogeno plasmatico inattivo, il plasminogeno; tale conversione avviene sia mediante una via fattore XII-dipendente (meccanismo che spiegherebbe il paradossale riscontro di complicanze trombotiche nei soggetti con deficit di fattore XII), sia per azione degli attivatori del plasminogeno. Tra questi ultimi, il ruolo preminente è svolto dall'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), prodotto in gran parte dalle cellule endoteliali, la cui efficienza catalitica aumenta considerevolmente quando si trova ancorato alla fibrina. Questa selettività di legame rende il t-PA un agente terapeutico estremamente efficace, poiché la sua azione litica si concentra in modo mirato sui trombi di recente formazione. Una volta generata, la plasmina è a sua volta soggetta a un preciso controllo da parte di molecole inibitorie, tra cui spicca l' $\alpha 2$ -antiplasmina (*$\alpha 2$ -plasmin inhibitor*), una proteina circolante in grado di complessare e inattivare rapidamente la frazione di plasmina libera [1].

Il ruolo dell'endotelio

L'evoluzione, la propagazione e il riassorbimento di un coagulo sono strettamente regolati dall'equilibrio dinamico tra le proprietà procoagulanti e quelle anticoagulanti dell'endotelio. In condizioni fisiologiche, la superficie endoteliale esprime differenti molecole in grado di inibire la risposta piastrinica e la cascata coagulativa, favorendo al contempo i processi di fibrinolisi. Questo insieme di meccanismi coordinati consente di scongiurare eventi trombotici, circoscrivendo l'innescò emostatico unicamente in corrispondenza della breccia vascolare. Per contro, eventi traumatici o mediatori di tipo proinfiammatorio possono compromettere tale azione protettiva, determinando una perdita delle capacità antitrombotiche del rivestimento vasale. Di seguito verranno esaminati nel dettaglio i molteplici fattori di difesa e le attività anticoagulanti del tessuto endoteliale integro [1].

- *Effetti di inibizione piastrinica.* Tra i compiti più immediati dell'endotelio sano vi è quello di fungere da vera e propria barriera anatomica, volta a impedire l'interazione diretta tra le piastrine circolanti e gli elementi del sottoendotelio, in particolare il collagene e il fattore di von Willebrand (vWF). Inoltre, la superficie endoteliale integra rilascia in modo attivo vari fattori biochimici in grado di inibire sia l'attivazione che l'aggregazione delle piastrine. Tra i principali agenti coinvolti figurano la prostaciclina (PGI_2) e il monossido di azoto (NO), la cui biosintesi è primariamente modulata dagli stress meccanici legati alla dinamica del flusso ematico. Sebbene i processi molecolari di meccanosensibilità cellulare debbano ancora essere del tutto chiariti, tale evento biologico si associa a riorganizzazioni della struttura citoscheletrica e della forma della cellula. Nello specifico dell'endotelio integro in con-

dizioni emodinamiche ordinarie, la produzione di PGI_2 è mediata dalla ciclossigenasi-1 (COX-1), presente in forma costitutiva, mentre la formazione di monossido di azoto è catalizzata dalla sintasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS). In aggiunta a tali vasodilatatori, l'endotelio esprime l'adenosina difosfatasi, un enzima che contribuisce all'azione protettiva metabolizzando l'ADP, noto fattore ad elevato potenziale nell'indurre l'attivazione e l'adesione piastrinica [1].

- *Effetti anticoagulanti.* L'endotelio integro è essenziale anche per separare i fattori della coagulazione circolanti dal TF localizzato nella parete vascolare. Oltre a ciò, la superficie dell'endotelio sintetizza e rilascia in modo attivo vari mediatori ad azione anticoagulante, capaci di inibire specifici passaggi del processo coagulativo. La trombomodulina e il recettore endoteliale della proteina C (EPCR) agiscono in sinergia legando, rispettivamente, la trombina e la proteina C, così da assemblare un complesso macromolecolare di membrana. In questa configurazione, il ruolo della trombina subisce un'inversione funzionale: essa perde la facoltà di attivare le piastrine e i fattori procoagulanti e promuove, al contrario, l'innescò della proteina C (una proteasi vitamina K-dipendente). La proteina C attivata, avvalendosi della proteina S come cofattore essenziale, va a costituire il complesso aPC/S, deputato al clivaggio e all'inattivazione dei cofattori Va e VIIIa. Sulle cellule endoteliali si trovano inoltre molecole di eparan-solfato (eparin-simili), che si associano all'antitrombina III (AT-III) incrementandone l'efficienza inibitoria. L'AT-III così potenziata neutralizza la trombina e diversi fattori attivati, nello specifico IXa, Xa, XIa e XIIa; tale principio fisiologico trova diretta applicazione clinica nella somministrazione dell'eparina e dei suoi derivati. Da ultimo, l'endotelio esprime l'inibito-

re della via del TF (TFPI) il quale, operando anch'esso in combinazione con la proteina S, agisce nelle fasi iniziali bloccando il complesso binario TF-fattore VIIa ed estinguendone l'attività catalitica [1].

- *Effetti fibrinolitici.* Componente fondamentale per via fibrinolitica è il tPA prodotto anch'esso dalle cellule endoteliali [1].

1.2 Trombofilia

1.2.1 Definizione ed epidemiologia

Nel 1995, l'Organizzazione Mondiale della Sanità insieme alla Società Internazionale di Emostasi e Trombosi (OMS/ISTH) ha qualificato la trombofilia come una predisposizione patologica del sangue a coagulare all'interno dei vasi sanguigni. Tra le sue manifestazioni principali figura il TEV — quadro clinico che ingloba l'embolia polmonare (EP) e la trombosi venosa profonda (TVP) — che quale rappresenta oggi una rilevante emergenza sanitaria su scala planetaria per la sua capacità di indurre ictus e infarto miocardico nella popolazione generale [4]. Nelle regioni geografiche dell'Europa e degli Stati Uniti, l'incidenza del TEV si attesta annualmente su circa 1-2 soggetti ogni 1.000 abitanti [5, 6], posizionandosi al terzo posto tra le cause più frequenti di decesso per patologie cardiovascolari [7]. A tal proposito, i *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* considerano questa affezione come una problematica medica di estrema gravità e spesso prevenibile, sebbene resti ampiamente sottodiagnosticata; si stima che sia responsabile di quasi 100.000 decessi ogni dodici mesi. Evidenze recenti suggeriscono inoltre che la diffusione della pandemia da COVID-19, unitamente alle connesse campagne vaccinali, abbia esercitato un impatto al rialzo sull'incidenza dei casi

di trombofilia [8]. Questo stato patologico si configura anche come uno dei fattori primari di mortalità per le donne durante le fasi della gestazione, del travaglio e del post-partum. La comparsa del TEV comporta lo sviluppo di complicanze tromboemboliche diversificate in funzione dello specifico distretto anatomico interessato [9]. Più nel dettaglio, l'occlusione vascolare determina un'embolia polmonare a livello dei polmoni, un attacco ischemico transitorio (TIA) o un ictus se localizzata nell'encefalo o a livello del collo nell'arteria carotide, un infarto del miocardio se colpisce le arterie coronarie, e un'ischemia mesenterica qualora interessi l'addome, soprattutto l'arteria mesenterica superiore o le sue diramazioni [10].

L'insorgenza della trombofilia in forma acquisita può essere ricondotta a determinati stili di vita, quali il tabagismo, l'assenza di esercizio fisico o l'immobilità forzata a seguito di interventi chirurgici, ma anche alla concomitanza di patologie tumorali, gravidanze e sindromi autoimmuni. D'altro canto, le varianti genetiche e le mutazioni ereditarie esercitano un influsso determinante nella genesi di questa condizione. La probabilità di sviluppare una trombofilia aumenta sensibilmente nei soggetti che presentano mutazioni sia in omozigosi che in eterozigosi, negli individui portatori di mutazioni multiple o in coloro che soffrono di una carenza congenita dei naturali sistemi anticoagulanti dell'organismo. Questa specifica deficienza ereditaria è riscontrabile nel 15% dei soggetti affetti da trombosi venosa (TV) che non hanno ancora superato i 45 anni di età. Oltre alle alterazioni del codice genetico, lo stato trombofilico può originare da deficit quantitativi o qualitativi di proteine anticoagulanti chiave come la proteina C, la proteina S e l'antitrombina. La carenza di ognuno di tali elementi è strettamente connessa a un deficit nell'inibizione delle vie anticoagulanti e a una conseguente iperattivazione della cascata coagulativa; l'alterazione del delicato equilibrio che governa

questi meccanismi biologici costituisce la causa scatenante dei fenomeni di trombosi [11].

1.2.2 Triade di Virchow

Con il termine «triade di Virchow» si vuole storicamente designare le tre principali anomalie che possono indurre un processo trombotico: danno vascolare, emodinamica di flusso sanguigno alterata e stato trombofilico. La maggior parte dei fattori di rischio per la trombosi agisce su almeno uno di questi componenti [12].

1.2.3 Tromboembolismo venoso

La trombosi venosa consiste nella formazione patologica di un coagulo ematico, o trombo, all'interno del compartimento venoso dell'organismo. Nonostante tale fenomeno possa interessare qualsiasi area del sistema circolatorio venoso, esso si manifesta prevalentemente a livello degli arti inferiori sotto forma di trombosi venosa profonda (TVP), oppure nei polmoni determinando un'embolia polmonare (EP). Entrambe le manifestazioni cliniche vengono raggruppate sotto la definizione globale di tromboembolismo venoso (TEV), una condizione ampiamente diffusa sia tra la popolazione generale che nei contesti clinici e ospedalieri, caratterizzata da un elevato tasso di complicanze e da un concreto pericolo di vita. I fattori scatenanti alla base del TEV si dividono in cause di natura ereditaria o congenita e cause di natura acquisita. Nella stragrande maggioranza dei soggetti affetti, quantificabile in oltre l'80% dei casi, è possibile individuare con chiarezza almeno un elemento predisponente; ciononostante, lo sviluppo della patologia è quasi sempre la conseguenza della concomitanza e della sinergia di molteplici fattori di rischio che agiscono simultaneamente [12].

1.2.4 Forme acquisite

La forma acquisita della trombofilia si manifesta nel corso della vita come conseguenza diretta di una vasta gamma di condizioni mediche e circostanze cliniche, tra cui spiccano le malattie autoimmuni, i periodi prolungati di ospedalizzazione, lo stato di gravidanza, i tumori maligni, gli squilibri di natura ormonale e le condotte di vita non salutari, con particolare riferimento all'obesità e a una marcata sedentarietà [11, 13]. Sotto il profilo epidemiologico, all'interno del contesto statunitense si calcola che il TEV sia responsabile di una quota di decessi compresa fra le 150.000 e le 200.000 unità su base annua. Di questi casi letali, circa un terzo viene ricondotto a complicanze che insorgono nella fase postoperatoria [14], mentre una percentuale intorno al 50% è generalmente correlata a degenze ospedaliere di lunga durata [15]. La frequenza di tali eventi subisce un incremento significativo nei reparti ospedalieri a più alta intensità di cure, come la terapia intensiva, dove la patologia arriva a colpire circa il 5-10% dei soggetti ricoverati. Per quanto concerne, invece, i pazienti sottoposti a interventi di chirurgia maggiore, sia pelvica che addominale, dovuti a patologie di natura oncologica, la prevalenza della trombosi venosa profonda (TVP) si attesta in una forbice che oscilla tra il 10% e il 40%. Con l'obiettivo specifico di isolare e comprendere gli elementi in grado di incrementare le probabilità di insorgenza della TVP, Theochari et al. [16] ha strutturato uno studio retrospettivo che ha posto in evidenza come i fattori predisponenti di maggiore impatto clinico per lo sviluppo della patologia siano rappresentati dal vizio del fumo, dall'avere un'età anagrafica avanzata che superi i 70 anni, dalla presenza di una storia clinica precedentemente positiva per episodi di TVP, dalla concomitanza di scompensi cardiaci o di affezioni a carico dell'apparato polmonare e, infine, dalla diagnosi di

diabete mellito.

Neoplasie

Attualmente, si stima che l'incidenza annuale di TEV nei pazienti oncologici si aggiri intorno allo 0,5%, a fronte dello 0,1% osservato nella popolazione generale [17]. Le neoplasie in fase attiva sono responsabili di circa un quinto (20%) della totalità degli eventi di TEV diagnosticati [18, 19]. Un elemento di notevole rilevanza clinica risiede nel profondo legame prognostico tra le due condizioni: la patologia neoplastica rappresenta infatti uno dei principali fattori di decesso nei pazienti colpiti da TEV e, allo stesso tempo, il TEV costituisce una complicanza temibile per il soggetto oncologico. A conferma di ciò, le analisi condotte nell'ambito del *Framingham Heart Study* su un campione prospettico di 9.754 individui, hanno evidenziato come l'insorgenza della trombosi associata al cancro (CAT) comprometta in modo significativo l'aspettativa di vita nei soggetti già affetti da TEV [20]. Contestualmente, i dati raccolti dal registro internazionale GARFIELD-VTE, che ha seguito una coorte di 10.315 pazienti con TEV presso 419 centri sanitari in 28 Paesi diversi, indicano un tasso di mortalità globale a sei mesi pari al 9,7%, con oltre la metà dei decessi (54,3%) attribuibile in modo diretto alla patologia tumorale [21]. Nel panorama delle cause di morte nei malati oncologici, il TEV rappresenta infatti la seconda causa più frequente, preceduto soltanto dalla progressione stessa della neoplasia [22].

I meccanismi molecolari e biologici che guidano la formazione del trombo nel paziente neoplastico presentano caratteristiche peculiari rispetto a quelli riscontrabili nella popolazione generale. Un ruolo cardine nella patogenesi della CAT è svolto dal TF, una proteina che esercita un'azione duplice promuovendo sia la crescita tumorale sia la genesi degli eventi tromboembolici.

Tale fattore viene sovraespresso in modo aberrante dalle cellule neoplastiche, determinando l'innescò della via estrinseca della coagulazione; questo stimolo porta all'attivazione del fattore X, con conseguente formazione di fibrina e reclutamento piastrinico. Oltre al TF, le cellule tumorali rilasciano una serie di ulteriori mediatori biologici: tra questi figurano elementi procoagulanti specifici capaci di attivare direttamente il fattore Xa, citochine infiammatorie che favoriscono la disfunzione dell'endotelio e altre sostanze secrete come le mucine carcinomatose, anch'esse in grado di alterare il normale processo coagulativo. Allo stesso tempo, il tumore ostacola la corretta attività del sistema fibrinolitico sintetizzando l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1). L'alterazione del fisiologico equilibrio tra le *pathway* procoagulanti e anticoagulanti sfocia infine nello sviluppo della CAT e delle sue gravi implicazioni cliniche [23].

Obesità

Nel corso del XXI secolo, l'obesità si è imposta come una rilevante emergenza sanitaria su scala planetaria, venendo identificata come una patologia metabolica complessa dalle vaste ripercussioni sistemiche. Tra gli effetti avversi di maggiore gravità clinica spicca la sua consolidata associazione, in qualità di fattore di rischio indipendente, con l'insorgenza del TEV. Questa patologia rappresenta la terza sindrome cardiovascolare per incidenza epidemiologica, superata per frequenza soltanto dall'infarto del miocardio e dall'ictus [24]. Studi clinici hanno dimostrato una correlazione positiva tra l'indice di massa corporea (BMI) e l'insorgenza di sindromi coronariche acute in pazienti con lesioni stenotiche delle arterie coronarie confermate mediante angiografia; un rischio più elevato di eventi cardiovascolari avversi a lungo termine (>3 anni) in seguito a intervento coronarico percutaneo (PCI) con stent a rilascio di

farmaco in pazienti obesi, dove il BMI è risultato predittore indipendente di trombosi dello stent; infine, una maggiore prevalenza di trombosi venosa idiopatica ed embolia polmonare linearmente correlante con il tasso di recidiva [25]. Queste osservazioni cliniche sono supportate dagli studi di su modelli murini di obesità indotta dalla dieta: gli animali modello mostrano un aumento della risposta protrombotica cerebrale alla sepsi sperimentale, una maggiore adesione endoteliale di leucociti e piastrine e un'estensione maggiore dell'ictus per occlusione dell'arteria cerebrale media. Infine, tramite microscopia confocale a scansione, sono stati evidenziati l'aumento dell'interazione tra cellule endoteliali e piastrine nel microcircolo del tessuto adiposo viscerale murino e segni di iperattivazione piastrinica locale (aumentata espressione di P-selectina e aggregati di piastrine e monociti) [25].

I meccanismi fisiopatologici che aumentano l'attivazione del processo coagulativo nell'obesità agiscono indipendentemente su fattori della coagulazione, piastrine ed endotelio.

- Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato l'associazione indipendente tra BMI e indice vita-fianchi (*waist-to-hip ratio*, *WHR*) da un lato, e livelli circolanti di fibrinogeno, fattore VII e inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI) dall'altro. Allo stesso modo, il calo ponderale ha portato ad una normalizzazione delle anomalie sopra descritte e a una corrispondente diminuzione del rischio clinico. Altri riscontri sono stati l'incremento dei livelli di complessi trombina-antitrombina e dell'attività dei fattori V e VIII della coagulazione, alterazioni associate a un'occlusione trombotica più rapida dell'arteria femorale o ad una trombosi della vena cava inferiore [25].
- Nei pazienti obesi sono stati rilevati piastrinosi e aumento del volume piastrinico medio (mean platelet volume, MPV), dove quest'ultimo è

stato correlato positivamente sia al BMI sia pattern elettrocardiografici suggerenti ischemia miocardica, ed è stato proposto come possibile predittore del rischio cardiovascolare. Inoltre, è stata riscontrata una maggiore aggregazione piastrinica su stimolazione con agonisti, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare o di comorbidità. Analizzando invece gli antagonisti, appare inferiore l'effetto antiaggregante dell'acido acetilsalicilico a parità di dose somministrata. La responsabilità dell'aumentata reattività piastrinica nell'obesità risiede probabilmente nelle modifiche della composizione della membrana plasmatica e dei livelli citoplasmatici di ciclo-ossigenasi 1 e 2 (COX1, COX2). Anche in questo caso la normalizzazione del peso corporeo ha ripristinato la corretta sensibilità piastrinica all'ossido nitrico e alla prostaciclina I_2 [25].

- L'incubazione *ex vivo* del secretoma (insieme di sostanze rilasciate dalla cellula nell'ambiente extracellulare) di cuscinetti adiposi espianati da pazienti obesi senza altri fattori di rischio cardiovascolare ha incrementato l'espressione di molecole di adesione e il segnale intracellulare pro-infiammatorio nelle cellule endoteliali [25].

Altro ruolo centrale nella patogenesi della trombosi nell'obesità è quello svolto dalle adipochine, particolari citochine rilasciate specificamente dagli adipociti.

- *Leptina*. Il recettore della leptina è espresso principalmente a livello ipotalamico, dove è responsabile di regolare senso di sazietà e metabolismo energetico, ma è presente anche sulla superficie delle cellule endoteliali e delle piastrine, con funzioni nettamente diverse. I livelli circolanti di leptina, di molto aumentati nei pazienti obesi, si sono di-

mostrati predittori di severità dell'aterosclerosi coronarica e di eventi cardiovascolari ricorrenti in pazienti maschi successivamente ad un episodio di sindrome coronarica acuta. Studi *in vivo* (Schäfer K., Konstantinides S. [25]) hanno evidenziato che topi carenti di leptina (ob/ob), nonostante l'obesità, presentano un incremento del tempo necessario per l'occlusione vascolare trombotica, tempo che invece veniva significativamente ridotto in seguito all'iniezione intraperitoneale di leptina ricombinante, sia in topi depleti per l'ormone, sia in elementi *wild-type*. Questi risultati sono supportati da ulteriori studi che hanno analizzato l'effetto di una serie di anticorpi monoclonali anti-leptina in termini di riduzione di danno arterioso e trombosi [26]. Sempre grazie a Schäfer et al. [25], è stato dimostrato come la leptina agisca anche sul recettore piastrinico, promuovendo l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e l'adesione piastrinica al fibrinogeno; effetti operati da diversi mediatori tra cui proteina chinasi C, fosfolipasi $C\gamma_2$ e A2 [27, 28] e dal complesso intrapiastrinico formato da fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K), proteina chinasi B (PKB) e fosfodiesterasi 3A (PDE3A) che riduce la produzione di cAMP [29]. Va evidenziato, tuttavia, che altri studi riportano invece l'assenza di una differenza significativa nella reattività piastrinica tra pazienti magri e pazienti obesi in seguito a stimolazione con leptina; queste contraddizioni potrebbero essere spiegate da una resistenza periferica alla leptina nei pazienti obesi, e dalla presenza di un'ampia variabilità interindividuale nella risposta piastrinica alla leptina, con pazienti «*low-responder*» sia tra i normopeso che tra gli obesi [25]. Infine, funzione della leptina è anche quella di aumentare l'espressione di TF e PAI-1 nelle cellule endoteliali, favorendo la formazione del trombo e ostacolando la fibrinolisi.

- *Proteina C reattiva (PCR)*. Il tessuto adiposo è responsabile di quello che viene definito «stato infiammatorio di basso grado», causato dall'incremento di produzione di PCR da parte del fegato in seguito al rilascio cronico di interleuchina-6 (IL-6) da parte degli adipociti viscerali [25]. Risultati sperimentali suggeriscono che la sovraespressione di PCR nei topi accelera la formazione di trombi arteriosi e su base aterosclerotica, spesso con emorragia intraplaacca [30, 31], oltre che l'espressione di P-selectina e l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali [32], e l'attività del TF nelle cellule muscolari lisce subendoteliali [33].
- *Inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI)*. Nei pazienti obesi sono stati rivelati anche livelli plasmatici aumentati di PAI, responsabili di accelerare il processo aterosclerotico e quindi trombotico inibendo la fibrinolisi [34], come dimostrato in modelli murini [35].
- *Adiponectina*. Al contrario delle precedenti molecole, l'adiponectina presenta proprietà antinfiammatorie, antianterosclerotiche e antitrombotiche, agendo su cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari, macrofagi e piastrine [25]. Così come avviene nell'obesità, topi carenti di adiponectina mostrano riduzione del tempo di formazione del trombo inseguito a lesione arteriosa e un'aumentata aggregazione piastrinica in seguito a stimolazione con agonisti [36]. I livelli plasmatici di adiponectina, infatti, correlano in modo inversamente proporzionale con l'attivazione piastrinica in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare [37]. I meccanismi di questo effetto protettivo sembrano risiedere nell'aumento di espressione dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) [38].

Infine, di rilievo è anche il ruolo svolto dalle alterazioni emodinamiche che si

verificano a causa dell'accumulo di adipe. Linicus et al. [39] ha dimostrato una correlazione tra BMI e una differenza di pressione tra vena cava toracica e addominale all'interno di un gruppo di 29 pazienti, derivante probabilmente dall'aumento di pressione toracica indotto dal proporzionale accumulo di grasso viscerale. Due dei pazienti con livelli maggiori di gradiente pressorio hanno subito fenomeni trombotici nonostante la profilassi a base di eparina a basso peso molecolare (LMWH), associati a manifestazioni cliniche quali edema periferico e lesioni cutanee agli arti inferiori. La compressione della vena cava porta ad una riduzione del ritorno venoso e quindi dell'output cardiaco, con conseguente rallentamento del flusso di sangue; fenomeno che si ritiene contribuisca all'incremento del rischio di trombosi venosa nei pazienti obesi. Questi dati sono ulteriormente supportati dai risultati analoghi ottenuti nello studio dell'associazione tra TEV e altre sindromi cliniche da compressione della vena cava, come gravidanza e neoplasie [39].

Gravidanza

Uno studio condotto da Simpson et al. [40] ha analizzato l'incidenza di TEV durante il periodo di gravidanza e del puerperio, basandosi sul *St Mary's Maternity Information System*, un database che raccoglie i dati provenienti dalla regione ovest del Regno Unito. Il tasso di incidenza del TEV è risultato di 85 casi su 100.000 gravidanze, dato molto simile ai tassi citati in altre ricerche, con il numero di eventi nel periodo postnatale che ammonta al doppio degli eventi antenatali, discrepanza rappresentata soprattutto dalla trombosi venosa profonda piuttosto che dall'embolia polmonare. Va sottolineato che i dati del postpartum sono stati raccolti prima della dimissione delle pazienti, fatto che rappresenta una ragione di sottostima degli eventi reali, in quanto non sono stati rilevati gli eventi manifestatisi in seguito alla dimissione, che si

suppongono essere tra il 20% e il 40% del totale degli eventi postpartum [40]. L'inclusione dei dati nell'analisi di regressioni *stepwise* ha poi evidenziato la gravidanza multipla come fattore di rischio indipendente per tromboembolismo prenatale, dato coerente con una maggior incidenza di questo tipo di eventi rispetto alle pazienti con gravidanza singola. Tasso maggiore di eventi trombotici è stato registrato anche in pazienti con gruppo sanguigno tipo A [40].

Dal punto di vista fisiopatologico, questi fenomeni si spiegano per la presenza di uno stato di ipercoagulabilità e ipofibrinolisi che accompagnano la gravidanza, col logico fine di limitare l'emorragia associata al parto. Più nel dettaglio, l'ipercoagulabilità è data da un aumento di concentrazione plasmatica di alcuni fattori della coagulazione, come il fattore VII che aumenta fino a dieci volte i valori normali, i fattori VIII, X, XII, il vWF e il fibrinogeno che invece triplica rispetto al periodo prenatale. Dall'altra parte, la ridotta fibrinolisi è causata da una riduzione di concentrazione, e quindi di attività, della proteina S, da una resistenza alla proteina C attivata e da un incremento dei fattori antifibrinolitici quali PAI-1 e PAI-2. Anche le piastrine subiscono diverse modifiche, probabilmente operate da variazioni dei recettori di superficie, riducendosi in quantità ma aumentando la propria reattività agli agonisti, quali adenosina difosfato (ADP) e trombina. Ulteriore contributo è dato da particolari nanoparticelle rilasciate dalle cellule trofoblastiche placentari, che si sono dimostrate in grado di esercitare un effetto protrombotico tramite azione sulle piastrine e sulle cellule endoteliali [41].

La gravidanza si caratterizza anche per modificazioni emodinamiche quali l'aumento della volemia e la riduzione delle resistenze vascolari sistemiche con conseguente riduzione di velocità del flusso venoso, modifiche operate dall'aumento di estrogeni, progesterone e relaxina. Ad aggravare la situazio-

ne si trova l'ostruzione meccanica al ritorno venoso operata per compressione della vena cava e delle vene iliache da parte del feto. L'incremento degli estrogeni agisce anche sul sistema coagulativo aumentando la sintesi dei fattori della coagulazione, riducendo invece l'attività dell'antitrombina e attivando la via del fattore 1 inducibile dall'ipossia (*Hypoxia-Inducible Factor 1*, *HIF-1*). Infine, la gravidanza agisce anche sulla composizione della parete vascolare, aumentando il numero di cellule muscolari lisce e riducendo la componente di elastina e quindi, complessivamente, la resistenza vascolare allo stress meccanico del flusso sanguigno [41].

Tra le forme specifiche di trombofilia acquisita in gravidanza, la più frequente è sicuramente quella dipendente dalla sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APLS o APS): la paziente produce anticorpi specifici, tra cui anti-cardiolipina e lupus anticoagulant, associati ad un incremento di tasso d'insorgenza e di ricorrenza degli eventi trombotici, sia venosi che arteriosi con un rapporto di 2:1 che coinvolgono prevalentemente gli arti inferiori. Oltre la metà degli episodi trombotici in pazienti con APS è stata ricondotta alla gravidanza, nonostante la profilassi antitrombotica, o all'uso di contraccettivi orali combinati. Identificare le pazienti a rischio risulta ulteriormente complicato dalle alterazioni dell'emostasi legate alla gravidanza stessa, che alterano i risultati di molti dei test di laboratorio disponibili [41].

Immobilizzazione

L'ospedalizzazione rappresenta un altro fattore importante che influenza il rischio di TEV: i pazienti ricoverati, sia medici che chirurgici, presentano un'incidenza di trombosi venosa profonda di 10 volte superiore rispetto ai soggetti non ospedalizzati [42]. Uno studio di meta-analisi ha mostrato un'associazione tra immobilità e aumento da due a tre volte del rischio di TEV

nei pazienti ricoverati in reparti medici [43]. Ricerche di Sartori et al. [44] hanno individuato nell'immobilità di almeno 3 giorni di durata un effetto significativo sul rischio di trombosi venosa profonda, con un'associazione più forte con la trombosi venosa profonda prossimale rispetto alla trombosi venosa profonda distale isolata (IDDDVT). Infine, uno studio caso-controllo di Weill-Engerer et al. [45] ha evidenziato la limitazione della mobilità come fattore indipendente di TEV (con OR: 1,73-5,64) in pazienti ospedalizzati di età superiore ai 65 anni; mentre un altro studio caso-controllo di Engbers et al. ha rilevato un incremento di 7 volte del rischio di trombosi venosa per immobilità e ospedalizzazione [46].

La fisiopatologia, in questo caso, risiede nella stasi vascolare indotta da un periodo di immobilità prolungato, rallentamento del flusso ematico che favorisce l'attivazione del processo coagulativo, uno dei tre cardini della triade di Virchow [44].

Oltre all'allettamento, nel concetto di immobilizzazione rientra anche l'apparecchio gessato. L'analisi caso-controllo condotta da Van Adrichem et al. [47] ha riscontrato un aumento di 4 volte del rischio di trombosi venosa nell'arco dell'anno successivo all'applicazione di tutte le forme di immobilizzazione con gesso, incremento che raggiunge le 8 volte nei pazienti con segmento ingessato al di sotto del ginocchio. Il rischio è risultato maggiore nei primi 3 mesi dall'applicazione, nei quali si è verificato il 90% degli eventi, e nei pazienti con patologia traumatica. Questo risultato si spiega per mezzo della teoria secondo cui l'immobilizzazione della caviglia determini la perdita della pompa muscolare scheletrica, fondamentale nella patogenesi della trombosi venosa nei pazienti immobilizzati a questo livello. Il maggior rischio di trombosi venosa nei casi traumatici rispetto a quelli immobilizzati in assenza di lesioni tessutali, invece, può essere spiegato tramite il danno alla parete

vascolare, che mette in contatto il sangue con il collagene e il TF, inducendo l'attivazione della cascata coagulativa [47].

Autoimmunità

Da studi epidemiologici condotti in Europa e negli Stati Uniti, è emerso che i pazienti con varie condizioni reumatologiche autoimmuni hanno sviluppato eventi trombotici con un'incidenza molto maggiore rispetto ai controlli, con rapporti di tasso da 1,75 per l'artrite reumatoide fino a 3,71 per il lupus eritematoso sistemico (LES) [48]. Un'analisi statistica svedese su pazienti con 33 diverse malattie autoimmuni (tra cui poliarterite nodosa, miositi, dermatomiositi, LES) ha riportato tassi di incidenza di embolia polmonare fino a 10 volte maggiori nel primo anno dal primo ricovero ospedaliero, con una riduzione del rischio progressiva nel tempo, fino alla quasi normalizzazione dopo 10 anni dall'inizio del follow-up [49].

Caratteristica centrale e comune a tutte le patologie autoimmuni è l'infiammazione cronica, che può spostare l'equilibrio omeostatico verso uno stato procoagulante attraverso molteplici vie differenti. L'interleuchina 6 (IL-6), noto mediatore dei processi infiammatori, stimola l'espressione del TF sulla superficie dei monociti, un fenomeno che potrebbe essere correlato alla contemporanea induzione della sintesi di proteina C reattiva (PCR) [50]. Lo stato infiammatorio altera l'equilibrio emostatico dell'endotelio: da un lato ne riduce le capacità anticoagulanti (sopprimendo la presenza di trombomodulina e proteoglicani eparinici), dall'altro ne incrementa il potenziale procoagulante mediante l'espressione di molecole di adesione leucocitaria. In condizioni fisiologiche, la trombomodulina — ampiamente espressa dal tessuto endoteliale — blocca la trombina impedendole di interagire con il fibrinogeno, mediante la competizione per i medesimi siti di legame. Tuttavia, evidenze in vitro

su modelli umani e bovini dimostrano che altri mediatori agiscono negativamente sulla trombomodulina: il fattore di necrosi tumorale alfa ($\text{TNF-}\alpha$) ne inibisce la trascrizione genica, mentre l'interleuchina 1 riduce l'attività funzionale della forma endoteliale [51, 52]. L'asse infiammazione-coagulazione passa anche attraverso la modulazione della fibrinolisi. La conversione del plasminogeno in plasmina — l'enzima deputato alla scissione della fibrina in prodotti di degradazione solubili (FDP) e regolato dall' α 2-antiplasmina — è catalizzata dall'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) o dall'attivatore di tipo urochinasico (u-PA). Entrambi questi attivatori sono finemente controllati dall'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1), mentre la trombina stessa contribuisce a bloccare il processo fibrinolitico mediante l'induzione dell'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAFI) [53]. A supporto di questi dati, è stata osservata una riduzione del PAI-1 e del rapporto PAI-1/t-PA inseguito all'inibizione del $\text{TNF-}\alpha$ in pazienti con artrite reumatoide e spondilite anchilosante [54]. Aspetto da sottolineare è che il ruolo del $\text{TNF-}\alpha$ nell'alterazione dell'emostasi è permesso dalla presenza del suo recettore tipo 2 (TNFR2), senza il quale il tasso di eventi trombotici risulta pari alla popolazione wild-type, come dimostra uno studio su modelli murini [55]. L'azione protrombotica del $\text{TNF-}\alpha$ si esplica anche tramite l'amplificazione dell'effetto inibitorio sulla tirosina fosfatasi SHP-1, che promuove l'interazione in senso protrombotico tra piastrine e cellule endoteliali [56]. Contraddizione da riportare è tuttavia rappresentata dalla possibilità di causare fenomeni trombotici anche per gli inibitori del $\text{TNF-}\alpha$, probabilmente attraverso l'induzione di anticorpi antifosfolipidi nella manifestazione clinica che prende il nome di «sindrome simil-lupica» [57].

Peculiarità delle patologie autoimmuni sistemiche è anche l'aumento di microparticelle rilasciate dalle piastrine, contenenti il TF e la fosfatidilserina

espressi sullo strato fosfolipidico esterno e in grado di catalizzare la cascata coagulativa interagendo con fattore Va, fattore VIII e fattore IXa [58].

Recenti osservazioni hanno infine portato alla luce il possibile ruolo delle trappole extracellulari dei neutrofili (NET) nella trombosi nelle malattie autoimmuni, in particolare nelle vasculiti. Le NET sono state associate ad una stimolazione dell'aggregazione piastrinica e alla formazione di trombi carichi di eritrociti [59].

1.2.5 Forme congenite

Il concetto di trombofilia ereditaria è stato introdotto per la prima volta nel 1965 da Egeberg, che descrisse una famiglia norvegese con un'elevata predisposizione alla trombosi dovuta a un deficit di antitrombina [60]. Da allora, l'identificazione di ulteriori difetti ereditari si è ampliata notevolmente: i deficit eterozigoti di proteina C e proteina S sono stati riconosciuti negli anni '80, seguiti dalle fondamentali scoperte della resistenza alla proteina C attivata (fattore V di Leiden) nel 1993 e della mutazione G20210A della protrombina nel 1996. Oggi, un'alterazione genetica trombofilica può essere riscontrata in almeno il 50% dei pazienti che presentano TEV [61].

Dal punto di vista fisiopatologico, come schematizzato dalla Figura 1.3, la maggior parte delle trombofilie ereditarie converge verso un esito comune: un'eccessiva attività della trombina. Ciò avviene attraverso due meccanismi principali: un'inadeguata neutralizzazione della trombina già formatasi, oppure la mancata regolazione della produzione di trombina alla sua origine. Il sistema anticoagulante naturale che preserva la fluidità del sangue si basa sull'antitrombina (che neutralizza la trombina e fattori IXa, Xa e XIa tramite il suo legame con l'eparan solfato sulla superficie dell'endotelio) e sulla pathway proteina C/proteina S (che inattiva i cofattori Va e VIIIa, limitan-

do così la generazione di trombina). L'attivazione della proteina C, mediata dal legame tra trombina e trombomodulina ancorate all'endotelio, permette il legame della stessa con uno specifico recettore che ne catalizza l'ulteriore attivazione. La proteina S, dall'altra parte, manca di un'attività enzimatica intrinseca, rappresentando per lo più un cofattore per la proteina C attivata. Tuttavia, la componente libera non legata a proteine del complemento (circa il 30-40% del totale), è capace di inibire direttamente l'assemblaggio dei complessi protrombinasico (formato da fosfolipidi e fattori Xa e Va) e tenasico (già affrontato in precedenza). Anche la via estrinseca subisce la regolazione da parte della proteina S, esercitata dalla sua funzione di cofattore dell'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI). L'alterazione di uno dei due bracci di questo sistema, sia attraverso mutazioni con perdita di funzione nelle proteine anticoagulanti, sia attraverso mutazioni con guadagno di funzione nei fattori procoagulanti, sposta l'equilibrio emostatico verso uno stato protrombotico [62, 63]. Le trombofilie ereditarie possono essere ampiamente classificate in due categorie: (1) deficit di anticoagulanti naturali (antitrombina, proteina C, proteina S), che sono rari ma conferiscono un elevato rischio trombotico; e (2) mutazioni con guadagno di funzione nei fattori procoagulanti (fattore V Leiden, protrombina G20210A) ed elevati livelli di proteine procoagulanti (in particolare il fattore VIII), che sono prevalenti ma conferiscono individualmente un rischio più moderato [61]. Ulteriori entità includono la disfibrinogenemia congenita e l'iperomocisteinemia correlata ai polimorfismi della metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), sebbene il significato clinico di quest'ultima sia stato sempre più messo in discussione [64].

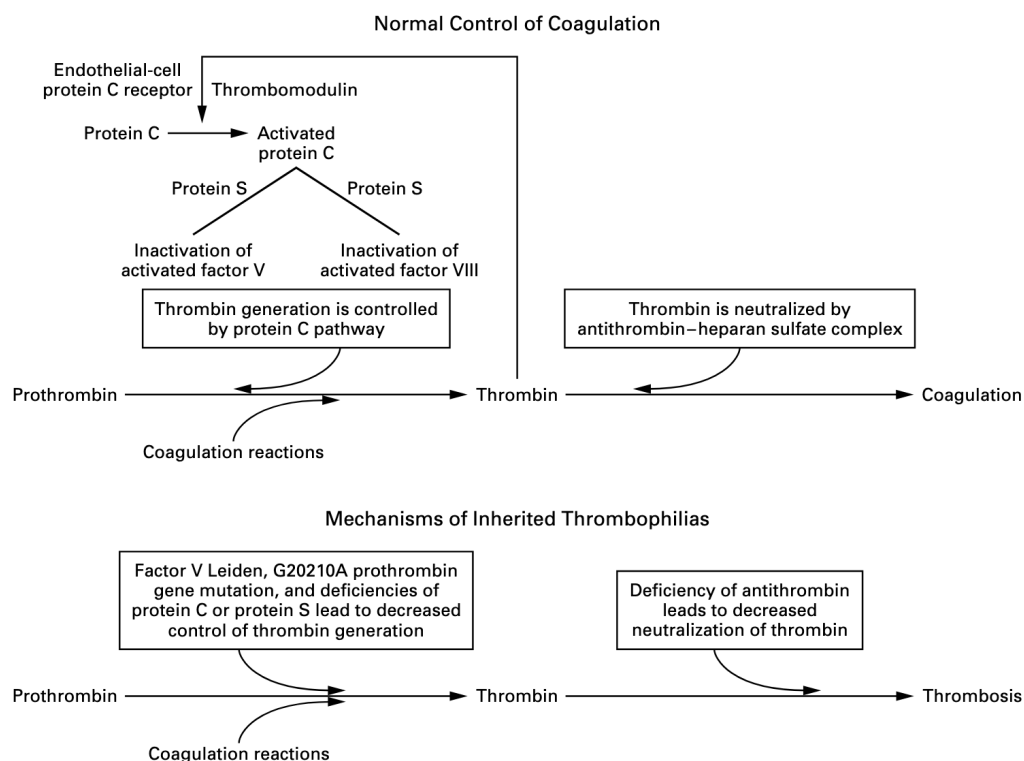


Figura 1.3: Rappresentazione schematica dei principali meccanismi di regolazione fisiologica della coagulazione e delle alterazioni più rilevanti nelle trombofilie ereditarie [62].

Difetti degli anticoagulanti endogeni

Deficit di antitrombina

La sede primaria di biosintesi dell'antitrombina risiede nell'epatocita. Il processo inizia con la produzione di un precursore proteico immaturo costituito da 464 amminoacidi, il quale viene poi elaborato mediante la scissione di un peptide di segnale di 32 residui posizionato all'estremità N-terminale; tale clivaggio genera la molecola matura e funzionale di 432 amminoacidi. La struttura comprende quattro potenziali siti di N-glicosilazione collocati sulle asparagine 128, 167, 187 e 224, i quali risultano normalmente legati a catene oligosaccaridiche; fa eccezione l'isoforma β , che si caratterizza per l'assenza

della catena glicanica in corrispondenza del residuo Asn¹³⁵. Sotto il profilo conformazionale, l'antitrombina presenta la tipica architettura tridimensionale propria della superfamiglia delle SERPINE, articolata su nove α -eliche (designate da hA ad hI) e tre foglietti β (foglietti A, B e C). Nel dettaglio, il foglietto A comprende due filamenti β disposti in modo parallelo, delimitando una porzione centrale definita «shutter» (otturatore) e un dominio superiore noto come «breach» (varco) [65].

La struttura dell'antitrombina è organizzata in tre domini principali: la regione amminoterminale NH_2 , una sezione ad alto contenuto glucidico (CHO) e la regione carbossiterminale ($COOH$). Dal punto di vista delle interazioni, l'estremità amminoterminale è deputata all'unione con l'eparina, laddove la porzione carbossiterminale interagisce direttamente con le serina proteasi. L'attività della molecola è regolata essenzialmente da due regioni chiave: il sito di legame dell'eparina, collocato nell'estremità N-terminale, e il Reactive Center Loop (RCL, o ansa del centro reattivo), situato all'estremità C-terminale. L'RCL possiede una specifica sequenza amminoacidica altamente affine al centro attivo del target proteasico, consentendo così il corretto svolgimento della sua funzione inibitoria [66].

Il gene dell'antitrombina (*SERPINC1*) presenta oltre 300 mutazioni note, e produce fisiologicamente due isoforme (α AT, che rappresenta più del 90% del totale, e la β AT, che rappresenta meno del 10% [67]. Quest'ultima si distingue per l'assenza di una catena polisaccaridica (3 al posto di 4) in corrispondenza del Asn¹³⁵ e, contemporaneamente, al sito di legame con l'eparina [68]; questa modifica conferisce all'isoforma β un'affinità maggiore per l'eparina [67], e quindi la capacità di influenzare, mediante la sua concentrazione plasmatica, l'efficacia del farmaco: maggiore è il rapporto $\frac{\alpha}{\beta}$, maggiore sarà l'effetto anticoagulante dell'eparina a parità di dose somministrata [69].

La prevalenza della carenza ereditaria di antitrombina si attesta intorno allo 0,02% a livello globale, valore che incrementa di 100 volte (2%) considerando la popolazione affetta da una storia di trombosi [70, 71]. La carenza di antitrombina si distingue in due varianti genotipiche: la forma eterozigote e quella omozigote, laddove quest'ultima risulta letale. Nei soggetti eterozigoti, le prime manifestazioni di TEV tendono a insorgere tra la prima fase dell'adolescenza e l'inizio dell'età adulta, conservando una spiccata suscettibilità allo sviluppo di TEV per tutta la vita [65]. Dal punto di vista eziopatogenetico, il deficit ereditario viene suddiviso in due categorie principali [72].

- Il deficit di antitrombina di tipo I è un disordine quantitativo, determinato cioè dalla riduzione dei livelli plasmatici di antitrombina che portano a loro volta a un calo della rispettiva attività. I difetti genetici che esitano in questa condizione alterano generalmente le fasi di trascrizione, traduzione o secrezione della proteina [73].
- Il deficit ereditario di antitrombina di tipo II è invece un disordine qualitativo, determinato cioè da difetti funzionali della proteina che ne riducono l'efficienza, pur mantenendo normali i suoi livelli plasmatici. Le possibili anomalie strutturali riscontrate sono alterazioni del sito di legame per l'eparina (in prossimità della regione N-terminale), del sito attivo (sito di legame per la trombina) oppure della regione che va dal filamento 1C al filamento 4B (verso la regione C-terminale) [74, 75]. Una forma particolare di difetto qualitativo è rappresentata dall'«antitrombina ipoglicosilata», un'alterazione post-trascrizionale riscontrata in alcuni pazienti che mostravano un deficit transiente di antitrombina [72].

Deficit di proteina C

La proteina C è una serin-proteasi glicoproteica vitamina K-dipendente sintetizzata dagli epatociti e codificata dal gene *PROC*, localizzato sul cromosoma 2q14.3. Ben 161 mutazioni di questo locus genico sono state riscontrate in pazienti con deficit della proteina C, (prevalentemente mutazioni missenso), trasmesse con un pattern autosomico dominante [76]. Una volta secreta dal fegato, entra in circolo in forma di complesso eterodimerico di una catena pesante e una leggera. L'attivazione della proteina C è mediata dalla trombina, tramite il legame con due proteine di membrana esposti dalle cellule endoteliali che fungono da cofattori: il recettore endoteliale specifico della proteina C (EPCR) e la trombomodulina [77].

I difetti di questo fattore della coagulazione corrispondono prevalentemente al tipo I [62] e si dividono in base alla severità in forme complete, più gravi, omozigoti o eterozigoti composte e fortunatamente molto rare (circa due casi per milione), e forme parziali, molto più frequenti (oltre 200 casi per 100.000 abitanti). Le forme severe si presentano già a partire del periodo neonatale in qualità di *purpura fulminans* (porpora fulminante), una condizione spesso letale causata da trombosi venosa massiva e coagulazione intravascolare disseminata (CID) [78]. Va detto, tuttavia, che non tutte queste alterazioni genetiche si associano a un quadro clinico evidente [77], che nei pazienti affetti corrisponde alla ridotta capacità di regolare la propagazione dell'attivazione della trombina ad opera dei fattori Va e VIIIa. Oltre a questo, il difetto si manifesta anche nell'infiammazione, dove la carenza di attività di proteina C porta ad una ridotta inibizione dei mediatori proinfiammatori e proapoptotici, e contemporaneamente un calo dell'induzione delle vie antinfiammatorie e antiapoptotiche, oltre che della stabilizzazione della barriera endoteliale. Nonostante questi rilevamenti, i pazienti con difetti genetici di proteina C non risultano più suscettibili alla sepsi [79].

Deficit di proteina S

Anche la proteina S (PS) è una glicoproteina vitamina K–dipendente che funge da cofattore essenziale per la proteina C attivata (APC) nell’inattivazione dei fattori Va e VIIIa [62], oltre a svolgere altre funzioni inibitorie in modo indipendente, già affrontate in precedenza. Il patrimonio genetico umano comprende due loci genici associati alla proteina S (PS), localizzati nel braccio corto e lungo del cromosoma 3 (regione 3p11.1/3q11.2): il gene codificante *PROS1* e lo pseudogene privo di funzione *PROS2*. *PROS1* ha un’estensione di circa 80 kilobasi ed è strutturato in 15 esoni. Mutazioni *loss-of-function* a carico di questo gene provocano la carenza di proteina S, nota condizione congenita predisponente alla patologia trombotica venosa, a trasmissione prevalentemente autosomica dominante [76] con una prevalenza tra lo 0,03% e lo 0,13% della popolazione generale [80]. Clinicamente, il deficit di proteina S (PS) conferisce un rischio di trombosi nel corso della vita superiore a 8 volte rispetto alla popolazione generale [81].

Dal punto di vista laboratoristico, la carenza di PS viene suddivisa in tre categorie fenotipiche: tipo I, carenza di natura quantitativa, caratterizzata dalla contestuale contrazione dei livelli sia di PS totale che di PS libera (la maggior parte dei casi); tipo II, patologia di tipo qualitativo, in cui l’attività funzionale risulta compromessa pur in presenza di concentrazioni antigeniche totali e libere nella norma (che consta solamente del 5-15% dei casi [82]); tipo III: una variante specifica caratterizzata da livelli ematici di PS totale adeguati, a fronte di una marcata riduzione della sola frazione libera. Studi genetici hanno evidenziato 131 mutazioni distinte in un campione di 203 nuclei familiari affetti; tra queste, appena sette varianti sono state associate alla forma qualitativa (tipo II), mentre la quasi totalità dei difetti molecolari

descritti è correlata a forme di deficit quantitativo (tipi I e III). Sul piano tipologico, le mutazioni di missenso costituiscono approssimativamente il 60% dei difetti riscontrati, mentre il restante 40% è rappresentato da mutazioni nonsense, difetti di splicing, oltre a inserzioni e delezioni di ampiezza variabile [76].

Iperattività dei procoagulanti endogeni

Fattore V di Leiden (resistenza alla proteina C attivata)

Si definisce «resistenza alla proteina C attivata» (APCR) l'incorporazione della proteina C attivata nel plasma di individui affetti da TEV che non produce il consueto allungamento dei tempi di coagulazione, a causa della resistenza all'inattivazione da parte del complesso proteina C/S. L'APCR si è poi rivelata essere un'alterazione di origine ereditaria; la sua forte correlazione con un'aumentata incidenza di eventi trombotici si è resa evidente allorché indagini successive ne hanno riscontrato la presenza in una percentuale compresa tra il 20% e il 50% dei soggetti con TEV [83]. La prevalenza di questo difetto genetico spicca nelle popolazioni di etnia caucasica, dove i portatori sani si attestano tra l'1% e il 15% [76]. La persistenza di tale varianza allelica e la sua rilevante frequenza nelle popolazioni caucasiche ipotizzano l'esistenza di un vantaggio selettivo associato al mutamento: ad esempio, una ricerca ha evidenziato come le donne portatrici della mutazione FVL presentino una riduzione statisticamente significativa del rischio di emorragie severe durante il parto rispetto alle non portatrici [84].

La causa più frequente dell'APCR congenita è riconducibile a una mutazione puntiforme con guadagno di funzione a carico del gene del fattore V della coagulazione, normalmente espresso sia negli epatociti sia nei megacariociti (e quindi contenuto poi nelle piastrine): nello specifico, si tratta della transi-

zione G→A in corrispondenza del nucleotide 1691, che determina la sostituzione dell'amminoacido arginina (R) con la glutammina (Q) nella posizione 506 (sito in cui avviene normalmente il taglio ad opera della PC attivata). Identificata per la prima volta nel 1994, questa mutazione è attualmente nota con la denominazione di fattore V Leiden (FVL): la proteina aberrante sfugge all'inattivazione mediata dalla proteina C attivata, promuovendo uno stato di ipercoagulabilità e incrementando sensibilmente la predisposizione al TEV [76]. In particolare, la condizione di eterozigosi per il FVL eleva la probabilità di sviluppare una trombosi venosa di un fattore compreso tra 3 e 8 [83]. Nonostante una giustificata rilevanza clinica, tale rischio è nettamente inferiore rispetto ai valori associati alle carenze ereditarie di fattori anticoagulanti precedentemente trattati. Anche la manifestazione dell'APCR indipendente dalla presenza della mutazione FVL risulta correlata a una maggiore incidenza di TVP: si osserva una relazione di tipo dose-risposta per cui a valori inferiori del rapporto di sensibilità normalizzato alla APC corrisponde un incremento del rischio trombotico [76]. Oltre al FVL, sono state individuate altre varianti genetiche della proteina.

- Nel 1997 è stata scoperta la variante denominata aplotipo HR2, distinta dal FVL ma ugualmente in grado di concorrere alla patogenesi dell'APCR. L'esatta interazione tra l'aplotipo HR2, il fenotipo APCR, la concentrazione di fattore V e il rischio trombotico complessivo non è ancora del tutto chiarita, alla luce dei risultati discordanti riscontrati in diversi approfondimenti [85].
- Successivamente sono state documentate altre due varianti del fattore V che alterano il secondo sito di scissione ad opera della PC (il fattore V Hong-Kong, FV:R306G, e il fattore V Cambridge, FV:R306T) [86]. Tali alterazioni presentano una frequenza estremamente ridotta

nella popolazione generale, e a differenza delle precedenti non sembrano configurarsi come fattori di rischio primari per il TEV se considerate singolarmente. Ciononostante, il potenziale contributo del fattore V Cambridge nel contesto di una concomitante presenza di altri fattori trombofilici sia congeniti sia acquisiti necessita di ulteriori studi [76].

- Le ultime varianti scoperte più di recente sono il fattore V Nara (W192R) e il fattore V Bonn (A512V), entrambe associate ad un fenotipo pro-trombotico [87, 88].

Mutazione G20210A della protrombina

Anche la protrombina (o fattore II) è una glicoproteina dipendente dalla vitamina K ed è codificata da un gene (*F2*) espresso sempre a livello epatocitario. L'anomalia genetica più rilevante associata alla protrombina è data dalla sostituzione di una guanina con un'adenina in posizione 20210 (G20210A), situata nella regione 3' non tradotta del gene, la cui prevalenza risulta maggiormente elevata (16%) nei soggetti di etnia caucasica, mentre nella popolazione generale si attesta intorno al 2%. Questa alterazione genetica comporta un incremento dell'attività protrombinica e il progressivo accumulo di trombina, con maggiore conversione di fibrinogeno in fibrina. Conseguenza di ciò è la predisposizione sia allo sviluppo di trombosi venosa profonda, soprattutto a carico degli arti inferiori e del circolo polmonare, sia ad una serie di manifestazioni ostetriche che sfociano nel ritardo di crescita intrauterino o nell'interruzione spontanea della gravidanza [11, 89]. Nei pazienti eterozigoti si osservano concentrazioni plasmatiche di protrombina incrementate di circa il 30% rispetto ai controlli sani (i tassi sono ancor più elevati nei soggetti omozigoti) associate ad una probabilità di sviluppare un evento di TEV stimata tra le 3 e le 4 volte superiore rispetto alla popolazione sana [11],

mentre nei pazienti omozigoti la probabilità degli eventi sale fino a 30 volte [76]. Oltre alle manifestazioni classiche di TEV, la presenza della mutazione G20210A è stata correlata ad eventi trombotici a carico del circolo portale, epatico o mesenterico, nonché alla trombosi dei seni venosi cerebrali (TSVC), predisposizione ulteriormente potenziata dall'eventuale concomitanza di altri fattori di rischio pro-trombotici (ad esempio contraccettivi ormonali) [90]. Oltre alla G20210A, altre varianti descritte a bassissima prevalenza sono la protrombina Yukuhashi (una mutazione di missenso—G1787T) e i polimorfismi C20209T e A19911G. A seconda dell'attività protrombinica, tali varianti hanno la peculiarità di poter essere correlate anche a un maggior rischio di sanguinamento [11].

Mutazioni del fibrinogeno

Il fibrinogeno è una glicoproteina da 340 kDa prodotta dagli epatociti, formata da due domini D esterni e uno E centrale connessi da connettori *coiled-coil*. È codificato da tre diversi geni per le catene B β (FGB), A α (FGA) e γ (FGG) che si trovano in una regione di 50 kb sul cromosoma 4 [91]. Ciascun gene produce separatamente polipeptidi di 491 (B β), 644 (A α) e 437 (γ) amminoacidi, rispettivamente. Le alterazioni congenite del fibrinogeno rappresentano condizioni patologiche poco frequenti e vengono classificate in due categorie principali: difetti di Tipo I e di Tipo II. Le patologie di Tipo I (comprendenti l'afibrinogenemia e l'ipofibrinogenemia) si caratterizzano per un'anomalia quantitativa della proteina plasmatica, la cui concentrazione nel sangue scende al di sotto dei valori minimi di norma. Al contrario, le forme di Tipo II (ovvero la disfibrinogenemia e l'ipodisfibrinogenemia) compromettono gli aspetti qualitativi e la funzionalità del fibrinogeno circolante [92]. Verranno di seguito affrontate soltanto le forme associate ad un maggiore

rischio trombotico.

- *Afibrinogenemia*. Descritta per la prima volta nel 1920 con una prevalenza di circa un caso su milione, rappresenta il 7% dei disturbi emorragici rari ed è più comune nelle donne rispetto agli uomini, manifestandosi frequentemente già nel periodo neonatale, ma in seguito attraverso sanguinamenti cutanei, orali, gastrointestinali, genitourinari o del sistema nervoso centrale, che rappresenta quest'ultimo la prima causa di mortalità nei pazienti affetti. A questo quadro, tuttavia, si affiancano paradossali eventi tromboembolici sia arteriosi sia venosi, che si verificano anche in assenza di fattori di rischio o terapie sostitutive. Una spiegazione di ciò sembra risiedere nella possibilità dell'aggregazione piastrinica di avvenire ugualmente mediante il vWF, grazie alla persistenza della generazione di trombina per la mancata *clearance* e il venir meno del ruolo sequestrante della fibrina [92].
- *Disfibrinogenemia*. Le disfibrinogenemie (e ipodisfibrinogenemie) sono condizioni a trasmissione autosomica dominante causate da mutazioni puntiformi missenso nella regione codificante di uno dei tre geni del fibrinogeno e risultano più frequenti dei disturbi di Tipo I, con la maggior parte dei pazienti asintomatici e identificati quindi casualmente tramite esami della coagulazione o per familiarità. Una revisione di oltre 260 casi evidenzia infatti che il 55% dei soggetti è asintomatico, il 25% presenta emorragie specialmente dopo traumi, chirurgia o nel postpartum, e il 20% mostra una predisposizione alla trombosi prevalentemente venosa, riconducibile al mancato legame con la trombina o alla formazione di coaguli resistenti alla plasmina [93]. Anomalie della struttura o della lisi del polimero sono state riscontrate in 5 pazienti su 33 affetti da ipertensione polmonare cronica tromboembolica, con im-

plicazioni per i casi di trombosi venosa profonda ed embolia polmonare a risoluzione incompleta, ma data la bassa prevalenza tra i pazienti con trombofilia, lo screening sistematico non è raccomandato. Nella sfera femminile la condizione può comportare aborti spontanei o trombosi nel postpartum non strettamente correlati alla concentrazione della proteina, mentre specifiche mutazioni della catena $A\alpha$ (come la sostituzione E545V) causano amiloidosi ereditaria con insufficienza renale per deposito di fibrille amiloidi, che rende il trapianto combinato fegato-rene l'unica terapia definitiva disponibile. Le principali alterazioni genetiche associate a queste manifestazioni protrombotiche sono la sostituzione Arg554Cys della catena $A\alpha$ (nota storicamente come Chapel Hill III, Paris V o Dusart), la mutazione Arg275His sulla catena γ (nota anche come Barcelona III, Haifa I e Bergamo II) e la variante Arg275Cys (nota anche come Cedar Rapids I) [92].

Mutazioni del fattore IX

Il fattore IX della coagulazione è una glicoproteina vitamina K-dipendente prodotta dagli epatociti. Come già trattato, è attivato tramite entrambe le vie intrinseca ed estrinseca, dal fattore XIa e dal complesso fattore VIIa-tissutale, rispettivamente, e esplica la sua funzione con l'attivazione del fattore X. Lo studio di Vlieg et al. ha riportato dati interessanti riguardo alla sua associazione col TEV attraverso la comparazione di gruppi di pazienti con diversi livelli ematici del fattore della coagulazione. Nello specifico, il 10% dei controlli sani presentava valori al di sopra del 90° percentile, contro il 20% dei pazienti in studio. Dal punto di vista clinico, il superamento di questo cut-off è stato associato con un rischio di 2 volte maggiore di trombosi venosa profonda, che supera le 3 volte per i valori più elevati di concentra-

zione ematica del fattore IX. È stato evidenziato, inoltre, come i livelli di FIX aumentano proporzionalmente all'età, pur non correlando, in assenza di comorbidità, con un aumento del rischio trombotico [94].

Il fattore IX è codificato dal gene *F9* di 34 kilobasi, costituito da 8 esoni e 7 introni, e situato sul cromosoma Xq27.1 [95]. Le alterazioni genetiche protrombotiche conosciute del fattore IX sono piuttosto limitate e si possono classificare in mutazioni puntiformi e amplificazioni di intere regioni esoniche.

- *Mutazioni geniche.* La prima mutazione puntiforme nota con acquisto di funzione è stata descritta da Simioni et al. (Fattore IX Padova) nel 2009 [96] in paziente di 23 anni, originario dell'Italia nord-orientale, che giunse all'attenzione dell'unità trombotica dell'Università di Padova in seguito ad un episodio di trombosi venosa profonda agli arti inferiori dopo una moderata attività di stretching. Il sequenziamento genico ha rilevato una mutazione puntiforme (G31134T) responsabile a sua volta di una sostituzione di una valina con un'arginina in posizione 338 della sequenza amminoacidica (R338L). Clinicamente, quest'anomalia non è stata associata ad alterazioni dei livelli ematici del fattore (che si attestavano intorno al 92% dell'intervallo di norma), bensì ad un incremento di attività di quasi 8 volte rispetto alle condizioni fisiologiche, in assenza di qualsiasi altra predisposizione trombofilica congenita o acquisita nota. Ulteriori approfondimenti hanno portato alla scoperta che il meccanismo protrombotico della sostituzione R338L si estende oltre il potenziamento della coagulazione: il FIX Padova aumenta infatti anche la resistenza alla fibrinolisi mediata dall'inibitore della fibrinolisi inducibile dalla trombina (TAFI) attraverso una maggiore generazione di trombina [97].

La seconda e ultima alterazione puntiforme (Fattore IX Shanghai) è sta-

ta recentemente identificata in un paziente cinese con storia di trombosi venosa profonda ricorrente. Localizzata in corrispondenza della stessa regione genica del FIX Padova, l'alterazione si costituisce in questo caso della sostituzione di un arginina con un acido glutammico in posizione 384 della sequenza amminoacidica (R384Q) a causa della transizione nucleotidica c.1151G>A. Il saggio di funzionalità della coagulazione mostrò un aumento di 1,5 volte di attività del fattore IX, nonostante una concentrazione inferiore al 30% della norma, indotta dalla terapia con warfarin alla quale il paziente venne sottoposto prima delle indagini e che non venne interrotta per evidenti ragioni etiche [98].

- *Amplificazioni geniche.* La prima amplificazione del fattore IX è stata individuata nel 2023 da Ma et al. [99] in un neonato giunto all'attenzione medica in seguito ad ittero e disturbi dell'allattamento. Durante il ricovero, sviluppò nistagmo ed epilessia resistente ai farmaci di prima linea. La angio-RM del circolo venoso cerebrale, effettuata in seguito ad anomalie sospette riscontrate alla tomografia computerizzata, evidenziò la presenza di un trombo nel seno sagittale superiore, oltre che difetti di riempimento alla confluenza dei seni. Dalla conseguente analisi genetica è emersa una duplicazione di 554 kilobasi comprendente il gene *F9* per intero. L'analisi laboratoristica specifica ha riscontrato un incremento dei livelli di fattore IX circolanti associati ad un raddoppio della sua attività.

Un'altra duplicazione dell'intero gene è stata riscontrata dallo stesso gruppo presso il Ruijin Hospital di Shanghai [95]. Il probando sviluppò una trombosi venosa dei seni cerebrali all'età di 16 anni; le indagini genetiche mostrarono la duplicazione genica associata ad un incremento funzionale di quasi 2 volte. Un altro paziente dello stesso case report

presentò episodi ricorrenti di trombosi splancnica, anche dopo profilassi a lungo termine con rivaroxaban. Dal sequenziamento del DNA emerse una triplicazione genica del fattore IX, associata ad un'attività di 2-2,5 volte superiore alla norma.

Fattore VIII

2.1 Caratteristiche genetiche

2.1.1 Sequenza genica

Il sequenziamento della porzione codificante per l'mRNA del gene del fattore VIII, lungo circa 9 kb, è stato completato per la prima volta nel 1984 da Gitschier et al. [100] determinando la sequenza dei frammenti di restrizione genomici contenenti esoni, identificati mediante ibridazione con il cDNA e analizzati tramite la tecnica di terminazione di catena con dideossinucleotidi. In questo modo è stata definita la struttura genomica delle giunzioni esone-introne e delle regioni di regolazione (promotore e segnale di poliadenilazione). Dalla comparazione di 8.860 nucleotidi tra cDNA e DNA genomico sono emerse soltanto due discrepanze:

1. Posizione 3.780: il cDNA presenta una guanina (codone GAG, acido glutammico), mentre il DNA genomico mostra una citosina, determinando una sostituzione amminoacidica conservativa con acido aspartico (codone GAC).

2. Posizione 8.728 (regione 3' non tradotta): si riscontra una guanina nel cDNA a fronte di un'adenina nel genoma.

2.1.2 Struttura genica

Come mostrato dalla Figura 2.1, la struttura genica si articola in 26 esoni con dimensioni variabili da 69 a 3.106 bp (mediana di 164 bp), valore in linea con le distribuzioni note per altre proteine. Tuttavia, due esoni si discostano nettamente dalla media [100]:

1. Esone 14 (3.106 bp): rappresenta uno degli esoni più estesi mai descritti e codifica la regione centrale di connessione con massa molecolare relativa (M_r) di 100.000, posta tra il dominio N-terminale (M_r 90.000) e quello C-terminale (M_r 80.000). Il clivaggio proteolitico di questo segmento intermedio pare essere correlato all'attivazione biologica della proteina.
2. Esone 26 (1.958 bp): comprende ben 1.805 bp appartenenti alla regione 3' non tradotta.

Gli introni coprono un intervallo compreso tra 207 bp e 32,4 kb, includendo sei elementi di lunghezza superiore a 14 kb. Nel complesso, il gene si estende per 186 kb (composti da 9 kb di sequenze esoniche e 177 kb introniche), a dimostrazione del fatto che non vi è stata una pressione selettiva efficace volta a compattare le dimensioni delle regioni introniche [100]. L'estremità 5' del gene del fattore VIII è racchiusa all'interno di un frammento di restrizione SstI di 1,2 kb. La traduzione ha inizio in corrispondenza del codone ATG situato in posizione +1, a cui segue una sequenza che codifica per i 2.351 amminoacidi costituenti il peptide segnale e la proteina matura. La perfetta identità riscontrata tra la sequenza del DNA genomico e quella del clone di

cDNA con la maggiore estensione verso il 5' (fino alla posizione -109) suggerisce che il primo esone contenga anche il sito d'inizio della trascrizione. La capacità di questo frammento da 1,2 kb di guidare l'espressione dell'mRNA del fattore VIII in cellule mammiere trasfettate conferma la presenza del promotore in tale regione [100]. Da diversi esperimenti di mappatura mediante protezione da RNasi è emerso che l'inizio della trascrizione dell'mRNA si colloca prevalentemente in posizione -170, oppure -172 con frequenza minore. L'assenza di motivi consenso per siti accettori di splicing nell'immediata adiacenza di queste posizioni esclude che i frammenti protetti derivino da un confine introne-esone, avvalorando l'identificazione del vero sito d'inizio al 5'. Tali rilevazioni confermano inoltre che il fegato rientra tra i siti di sintesi della proteina, mentre l'assenza di segnale negli altri campioni analizzati, sia per protezione da RNasi sia per analisi *Northern blot*, ne sottolinea la selettività d'espressione [100]. L'esame della sequenza fiancheggiante al 5' ha evidenziato l'elemento GATAAA posizionato 30 bp a monte del sito d'inizio della trascrizione. Tale motivo presenta un'elevata omologia con la sequenza canonica TATA (o di Goldberg-Hogness), di norma collocata 25-35 nucleotidi prima dei siti di cap negli eucarioti e ritenuta essenziale per il corretto reclutamento della RNA polimerasi II. Nella regione attorno alla posizione -70 bp non sono invece state individuate sequenze riconducibili al motivo "CAT" [100, 101]. Nella regione 5' non tradotta, in posizione -131 rispetto al sito di inizio della traduzione (+1), è presente un ulteriore codone ATG. Questa tripletta a monte non può tuttavia avviare la sintesi del fattore VIII a causa della presenza di 7 codoni di stop distribuiti in tutti e tre i quadri di lettura nei 128 nucleotidi compresi tra l'ATG a monte e la posizione +1 [100]. Infine, la regione 3' non tradotta si estende per 1.805 nucleotidi, conteggiati a partire dal codone di stop TGA fino all'inizio della coda di poli(A). Il sito di

poliadenilazione, desunto dai cloni di cDNA, è preceduto di 19 basi dalla sequenza segnale canonica AATAAA e da un secondo motivo di riconoscimento meno conservato identificato come CATTG [100].

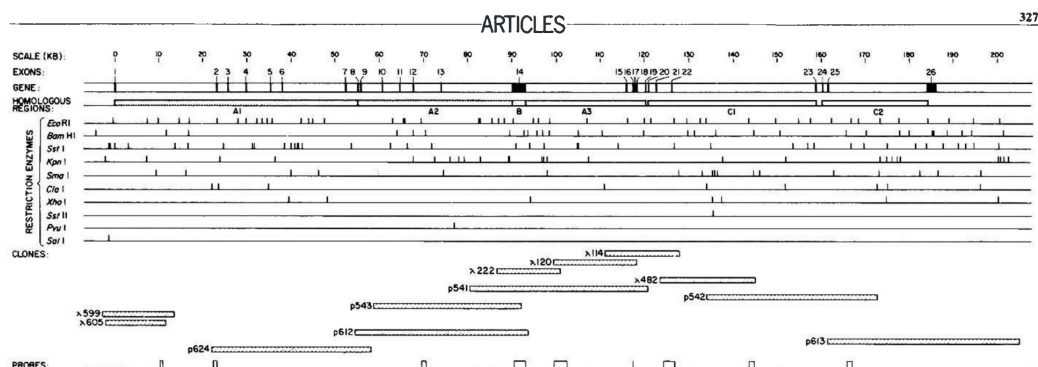


Figura 2.1: Mappa del gene del fattore VIII umano. La struttura del gene è rappresentata schematicamente da una barra vuota; i 26 esoni sono aree piene disegnate in scala. La direzione della trascrizione va da sinistra a destra. La scala graduata delle dimensioni in kb è riportata sopra il gene; il codone di inizio ATG è posizionato al nucleotide 1. Immediatamente sotto il gene sono indicati l'estensione del dominio «A» triplicato, del dominio unico «B» e del dominio «C» duplicato [100].

2.2 Struttura tridimensionale e funzione

2.2.1 Domini proteici

L'analisi delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche del fattore VIII ha messo in luce un'organizzazione molecolare basata su moduli ripetuti, come si evince dalla Figura 2.2. La proteina, espressa e secreta principalmente a livello delle cellule sinusoidali epatiche [102] e in minima parte dall'endotelio splenico e linfonodale [103], è strutturata in tre domini «A» (ciascuno di 330-380 amminoacidi), una regione «B» a sequenza unica di circa 925 amminoacidi e due domini «C» di circa 160 amminoacidi, disposti secondo la linea

A_1 - A_2 - B - A_3 - C_1 - C_2 , senza che vi sia un raggruppamento fisico degli esoni corrispondenti. Il confronto sequenziale rivela una similarità amminoacidica a coppie di circa il 30% tra le tre unità A (con $\frac{1}{5}$ dei residui amminoacidici perfettamente conservato) e di quasi il 40% tra le due regioni C [104]. L'eventuale origine del gene per duplicazione segmentale del DNA trova solo una parziale conferma nella posizione dei confini introne-esone. Nei domini C, le giunzioni introniche coincidono esattamente con le estremità dei moduli C_1 e C_2 , e un introne delimita in modo netto anche il passaggio tra A_3 e C_1 , concordando con i meccanismi evolutivi di ricombinazione genica mediati dagli introni. Al contrario, le transizioni A_1 - A_2 e A_2 - A_3 non mostrano interruzioni e risultano entrambe racchiuse all'interno di singoli esoni. La conservazione incompleta dei confini degli introni all'interno dei moduli ripetuti suggerisce una storia evolutiva articolata: mentre alcune giunzioni introniche facevano probabilmente parte del gene ancestrale e si sono duplicate insieme ai segmenti codificanti, altre sono andate perdute o si sono inserite successivamente [100].

Domini A

La triade di domini A (A_1 , A_2 e A_3) che caratterizza il fattore VIII mostra una spiccata omologia strutturale con il fattore V e la ceruloplasmina. Ciascun dominio A racchiude due strutture centrali a barile β altamente conservate, organizzate in modo concentrico e lievemente inclinate l'una rispetto all'altra, nelle quali la porzione secondaria di ogni sottodominio si interfaccia con quella iniziale del modulo successivo [105]. I ponti disolfuro interni, posizionati lungo la faccia inferiore della molecola, mantengono un'architettura identica in tutte e tre le proteine comparate. Inoltre, la regione A ospita un sito di coordinazione per un singolo atomo di rame [106, 107].

Sebbene i modelli molecolari descrivano con elevata fedeltà l'impalcatura centrale (core) del FVIII, la conformazione dei loop superficiali è nota solo in via approssimativa. Proprio su un loop esterno del dominio A₂ (residui 484–508) si localizza un importante epitopo target per alloanticorpi e autoanticorpi. Sempre all'interno del dominio A₂, il segmento compreso tra gli amminoacidi 558 e 565 stabilisce il contatto primario con il FIXa, costituendo l'interfaccia catalitica fondamentale tra il cofattore attivato e l'enzima [108, 109, 110]. Tra le varie subunità, A₂ è quella che tende a dissociarsi con maggiore facilità dal complesso attivo FVIIIa. Infine, un sito di ancoraggio secondario per il FIXa è fornito da una sequenza affiorante in superficie nei pressi dell'estremità N-terminale di A₃ (residui 1810–1818). In assenza di supporto fosfolipidico, il reclutamento del FX è mediato dal settore C-terminale del peptide acido di connessione "A₁" del dominio A₁ (residui 337–372) [111]. La regolazione da parte della proteina C attivata coinvolge invece un sito situato nella metà C-terminale di A₃, tra His2007 e Val2016 [112]. A livello intracellulare, la regione compresa tra i residui 227 e 336 del dominio A₁ ospita diverse sequenze coinvolte nel legame con lo chaperon BiP; eventi mutazionali in questa regione compromettono la corretta secrezione della proteina, evidenziando il ruolo critico ricoperto dal residuo Phe309 [105].

Dominio B

Il dominio B presenta caratteristiche peculiari che permettono di speculare sulla sua origine, poiché i suoi 925 amminoacidi occupano la quasi totalità dell'esteso esone 14 (3,1 kb), il quale racchiude anche il margine 3' della ripetizione A₂ e il margine 5' della ripetizione A₃, assetto che fa ipotizzare che un gene processato, derivato da un intermedio di mRNA, possa essere penetrato ancestralmente all'interno di un breve esone contenente la giunzione A₂-A₃,

spiegando così anche l'eccezionale lunghezza dell'esone 14 [100].

Dal punto di vista funzionale, la regione B funge da ponte tra il frammento N-terminale di massa molecolare relativa (M_r) di 90.000 (composto da A_1 e A_2) e quello C-terminale di M_r 80.000 (A_3 , C_1 , C_2) [100]; la sua rimozione per via proteolitica è direttamente legata all'attivazione della proteina, collegando la struttura dell'esone 14 a un'unità fisiologica definita [113, 114]. Il dominio B ospita inoltre la quasi totalità dei legami oligosaccaridici N-glicosilati della proteina e manifesta un'elevata variabilità di sequenza tra le diverse specie animali, caratteristica ulteriore che sostiene l'ipotesi che questo dominio non intervenga nell'attività funzionale del FVIII, ma solo nella sua attivazione [115]. Sono proprio queste caratteristiche molecolari a suggerire che questo dominio rivesta un ruolo chiave nei processi di maturazione intracellulare e offra specifici siti di clivaggio proteolitico, sia antecedenti alla secrezione, sia durante la conversione a cofattore attivo catalizzata dalla trombina. Inoltre, le strutture oligosaccaridiche legate all'asparagina presenti in questa regione interagiscono specificamente con i domini di riconoscimento dei carboidrati del recettore dell'asialoglicoproteina; tale via di degradazione, sensibile all'asialo-orosomucoide e riconducibile a questo stesso recettore, partecipa attivamente al catabolismo in vivo del FVIII coagulativo [116].

Domini C

Con un'estensione di 153 amminoacidi e un'identità di sequenza pari al 42%, il dominio C_1 affianca il dominio C_2 , costituito invece da 160 amminoacidi. La caratterizzazione cristallografica del dominio C_2 del fattore VIII rivela una conformazione a sandwich β centrale, da cui sporgono loop e forcine β responsabili della creazione di una superficie idrofobica. All'apice della prima forcina β , tale area idrofobica racchiude i residui M2199 e F2200. Si ritiene

che due coppie di amminoacidi apolari protrusi da loop adiacenti costituiscono il nucleo funzionale di un rilevante dominio di ancoraggio lipidico. La sequenza del dominio C₁ mostra un elevato allineamento strutturale con il dominio C₂, differendone tuttavia per l'assenza dei filamenti β 3 e 4, oltre che della presunta regione di legame per i lipidi [105]. Posizionata sull'estremità opposta rispetto alle sequenze ammino- e carbossi-terminali e al singolo ponte disolfuro, la potenziale superficie di legame lipidico del dominio C₂ interagisce con un anticorpo monoclonale umano in grado di ostacolare l'unione con i fosfolipidi. Esperimenti di mutagenesi sito-specifica mirati su selezionati residui idrofobici o carichi positivamente di questa superficie dimostrano una riduzione dell'affinità del dominio C₂ verso talune frazioni di inibitori anti-FVIII [117]. Oltre a ciò, il dominio C₂ del FVIII presenta regioni d'interazione per il vWF, la trombina e il fattore Xa. Sembra essere la porzione carbossi-terminale bC₂Q la responsabile sia dell'ancoraggio alle membrane piastriniche attivate sia del legame al vWF [105]. Benché non sia stato effettuato un confronto con il potenziale legame con lo zimogeno, il dominio C₂ isolato possiede siti capaci di ancorare sia la trombina sia il FXa. Sebbene il dominio C₁ non sia stato espresso singolarmente, l'impiego di peptidi baculovirali recanti la sequenza C₁—C₂ indica che il dominio C₁ amplifica in misura rilevante l'associazione del fattore di von Willebrand (vWF) al dominio C₂. La regione C₁—C₂ è inoltre in grado di legare gli zimogeni FIX o FX, o le rispettive forme attive; ciò costituisce verosimilmente un'interazione orientata e meno specifica del FVIII con l'enzima e il substrato nel sistema intrinseco della coagulazione, intesa a facilitare l'attivazione del FX [118].

a

```

A1 1 ATRRYYLGAVELSHOYMQSOLGELPYDAR--FPPRYPKSFPFNTSVVY
      1 2
A2 330 PEEPQLRMKNMEEAEYDDDLTSEMDEVVFDDONSPSFQIRSVAKKHPKTWHYIAAEEEDWDYAPLVLAP---DDRSYKSOYLNNGPQRTGRKY
      8 9
A3 1649 EITRTTLOSDQEEI-DYDDTISV-EMKKEOFDIYDEENQSPRSFQK---KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL-RNRAQSGSVQ-----F
      14 15

      ** **** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
      ** **** ** ** ** * ** * ** ** ** ** ** ** ** **

      2 3 3 4
A1 47 KKTLEFVEFTDHLFNIAPPPW---MGLLGPTIAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVSYMKASEGAEYDDQTSQREKEDDKYFPGSHTYVMQVLKENG
      9 10 10 11
A2 424 KKVRFMAYTDFTKT---REAIQHEGILGPLLYGEVGTLLIIPKNQASRPNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKML---KDFILPGEIFKYMVTYVEDGP
      15 16
A3 1730 KKVVFQFTDGSFTOPLVYRGELNEHLLGPLYIAEVEQNIHVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQDQGAEP-----RKNFVKPNETKTYFKVQHHMAP
      15 16

      ** * ** ** * * ** ** * ** ** * ** * ** * **
      ** * ** ** * * ** ** * ** ** * ** * ** * **
      ** * ** ** * * ** ** * ** ** * ** * ** * **

      4 5 5 6
A1 147 MASDPLCLTYSYSHVDLYKOLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTO---TLHKFILLFAVDFGKSMHSETKNSLM-----DDRDAASARAWPKMHTVNGY
      11 12 12 13
A2 522 TKSDPRLCTRYSSFYAMERDLASGLIGPLLICYKESVDQGRNQIMSDKRNHILFVDFENRSWYL-TENIQRFPLNPAGVQLEDFEQ-ASNIMHSINGY
      16 17 17 18
A3 1825 TKDEFQCKAWYFSDVLEKDVHSLIGPLLCHYNTLHPANGRQVTVQEFALFFTIFDETQSWYF-TENMERKCRAPCNIQMDPTFK-ENYRFHAINGTI
      16 17 17 18

      *** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * ** ** ** * *
      **** * * * * ** ** ** * * * * ** ** ** * *
      ** * * * ** ** ** * * * * ** ** * * * *

      6 7 7 8
A1 239 NRSLPGLIGCHRSVYNYHVGITPEVHSIFLEGHTFLVRNH---RQASLEISPIFLTAQTLMLQGLFLFCHISSHQHGMAYVKYDSC
      13 14 13 14
A2 622 FOSLQ-LSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMY--Y-EDTLTLPFSGETVFMHSMENPGLMTLGCNHSDFRNRGMTALLKYSSC
      18 19 18 19
A3 1926 MDTLPGLYMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIMRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSH
      18 19

      ***** * ** ** ** ** ** ** * * * * * * * * * *
      *** * * ** ** ** * ** ** * * * * * * * *
      * * * ** ** ** * ** ** * * * * * * * *
  
```

b

```

C1 2020 KQTPPLGMAIGHIRDFQITASGQYGO---HAPKLARLHYSGSINAWSTKE---PFSWIKVDLAPMIHGIKTQGARQKFSYLIISQFIIMYSLGKKKQT
      20 21 21 22
C2 2173 SCSPMLGME SKATSDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLNLQGRSNARPPQVNNPKELQVDFQTKMYTGYTQGVKSLTSMYKFEFLISSQDGHQMTL
      24 25 24 25

      * **** * * ** ** * * ** * * ** * * ** *
      * **** * * ** ** * * ** * * ** * * ** *

      22 23 23 24
C1 2115 YRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIXHNIIFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCOLN
      25 26
C2 2274 FFQN---GKVKVFQGNQDSFTPVNSLDPLLTTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
      25 26

      * * ** ** * * ** ** * * **
      * * ** ** * * ** ** * * **
  
```

c

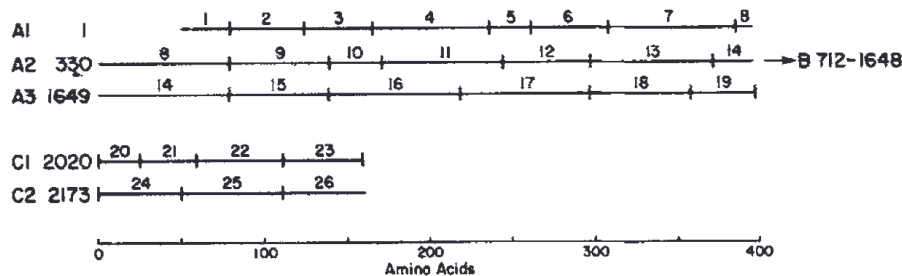


Figura 2.2: Domini omologhi del fattore VIII e confini degli introni. La sezione a mostra la triplicazione dell'unità «A» mediante l'allineamento di tre sequenze amminoacidiche, in cui i numeri degli amminoacidi precedono ciascuna riga, le frecce indicano la posizione degli introni affiancate dai rispettivi numeri degli esoni e l'asterisco indica gli amminoacidi conservati. La sezione b illustra la duplicazione dell'unità «C», mentre la sezione c presenta la rappresentazione delle unità ripetute A e C con la posizione degli introni indicata da linee verticali e gli esoni numerati [100].

2.2.2 Cinetica del FVIII

Meccanismo di attivazione

Il fattore VIII circola nel plasma in forma di zimogeno, complessato per circa il 95% al vWF (in equilibrio dinamico) che ne aumenta l'emivita a 10 ore (significativamente inferiore rispetto a quella del vWF stesso). Come mostrato dalla Figura 2.3, la sua conversione ad enzima attivo avviene ad opera della trombina (FII) tramite tre tagli proteolitici: il primo a livello della Arg371, tra i domini A₁ e A₂, il secondo in corrispondenza della Arg740, tra i domini A₂ e B [119], e l'ultimo a livello della Arg1689, nella regione C-terminale acida del dominio A₃ [120]. La conversione del FVIII nella sua variante attiva dà origine a una struttura eterotrimerica instabile formata dalle subunità A₁, A₂ e A₃—C₁—C₂ che, rilasciando il segmento a₃ contenente la Tyr1680, perde l'affinità per il vWF [120]. La subunità A₁ del FVIIIa si caratterizza per una regione terminale di 36 amminoacidi (Met337-Arg372) ad elevato contenuto di residui acidi. La rimozione di questo segmento, conseguente al clivaggio a livello di Arg336 effettuato dalla proteina C attivata, condurrà in seguito alla definitiva inattivazione del cofattore [105].

Il FVIIIa si separa quindi dal vWF, come si evince dalla Figura 2.4, e lega la superficie fosfolipidica delle piastrine attivate, concentrandosi localmente, così da predisporre per l'interazione con i fattori IXa e X tramite i residui

da Ser558 a Gln565 della catena A₂, e i residui da Glu1811 a Lys1818 nella catena A₃ [121]. Il legame con i fosfolipidi piastrinici avviene tramite interazioni idrofobiche ed elettrostatiche ad opera del dominio C₂.

Diversi autori riportano risultati contrastanti nel determinare le posizioni esatte degli amminoacidi coinvolti nelle interazioni idrofobiche: secondo le indagini mutazionali di Gilbert et al. (2002) [122], l'interazione con i lipidi coinvolge due coppie contigue di residui idrofobici orientati verso il solvente, ossia Met—Trp2200 e Leu—Leu2252; Fay et al. (2006) [123] riporta invece di aver individuato gli amminoacidi idrofobici in questione nelle coppie Met2199/Phe2200 e Leu2151/Leu2152, evidenziando come siano capaci di associarsi a catene aciliche idrocarburiche; infine, Fang et al. (2007) [105] identifica nel residuo Trp(2313) nel loop numero 4 un ruolo fondamentale nell'interazione lipidica di membrana e nel processo di secrezione extracellulare della proteina. Le interazioni elettrostatiche, invece, sono mediate da un anello di residui basici che include Arg2215, Arg2220, Lys2227 e Lys2249, localizzati appena sopra i residui idrofobici, i quali formano ponti salini con i gruppi polari anionici della fosfatidilserina [123]. È proprio grazie all'ancoraggio alla superficie fosfolipidica che il FVIIIa catalizza l'attivazione del FX da parte del FIXa, accelerandola di ben cinque ordini di grandezza [105]. Il clivaggio proteolitico del peptide acido a₃ all'estremità N-terminale del dominio A₃, catalizzato dalla trombina, determina per il FVIII la perdita di uno dei suoi principali siti di ancoraggio ad alta affinità per il vWF. Questa dissociazione consente verosimilmente a una superficie lipidica dotata di attività emostatica di competere con il vWF, scalzandolo dal dominio C₂ del FVIIIa.

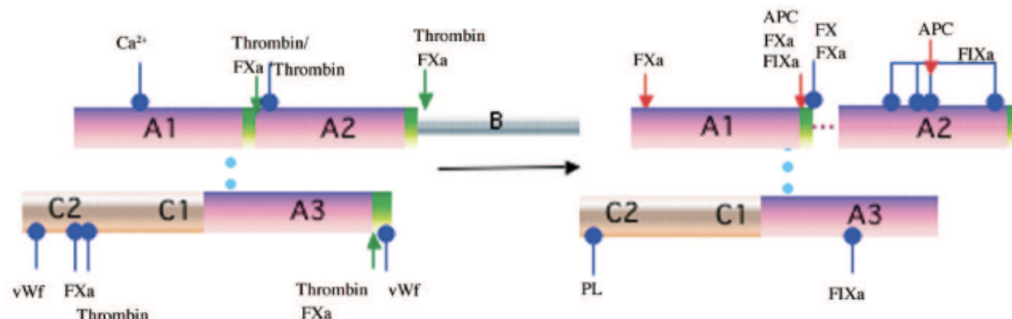


Figura 2.3: Fattore VIII e fattore VIIIa. I domini A e C sono rappresentati rispettivamente in rosa e in oro. I segmenti ricchi di amminoacidi acidi a_1 , a_2 e a_3 sono in verde. Il dominio B in argento non è in scala. Le catene pesante e leggera dell'eterodimero del fattore VIII sono unite da un ponte dipendente da uno ione metallico (Cu), raffigurato da cerchi azzurri. I siti di taglio che determinano l'attivazione sono indicati da frecce verdi, mentre quelli di inattivazione da frecce rosse. Le posizioni approssimative dei siti di interazione macromolecolare e degli ioni metallici sono contrassegnate dai simboli a forma di lecca-lecca blu. L'associazione elettrostatica tra A_1 e A_2 è indicata dalla linea tratteggiata color prugna [123].

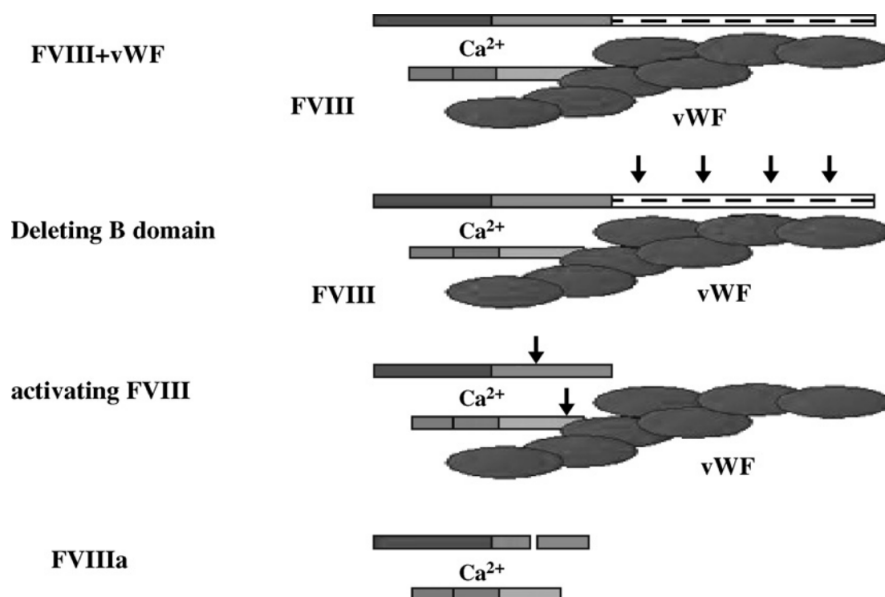


Figura 2.4: La relazione tra il FVIII e il vWF. In seguito al clivaggio da parte della trombina che rimuove la porzione rimanente del dominio B e uno dei siti di legame ad alta affinità per il vWF, il FVIII si trasforma in FVIIIa eterotrimerico [105].

Interazioni molecolari e funzione dei domini

Tre distinte regioni appartenenti alla subunità A_2 (373—395, 418—428 e 518—533) stabiliscono interazioni con il dimero A_1/A_3 — C_1 — C_2 . Se presa singolarmente, la subunità A_2 presenta una limitata capacità cofattoriale nello stimolare l'attivazione del FX mediata dal FIXa; tuttavia, la presenza della subunità A_1 ne incrementa notevolmente l'efficienza. La porzione C-terminale della subunità A_1 (comprendente i residui 337—372) è ritenuta un sito chiave di contatto per A_2 , rivestendo un ruolo essenziale per il FVIIIa. Questa specifica sequenza di A_1 sembra essere fondamentale per garantire il corretto orientamento spaziale della subunità A_2 nei confronti del FIXa all'interno del complesso cofattoriale [105]. I residui compresi tra le posizioni 337 e 372 costituiscono la porzione C-terminale acida della subunità A_1 (a_1) e stabiliscono un contatto con il FXa durante l'inattivazione proteolitica del FVIIIa. Questa specifica sequenza amminoacidica ricopre un ruolo chiave nell'attivazione del FVIII catalizzata dal FXa, interagendo direttamente con l'enzima. Esperimenti condotti su questo segmento ne hanno evidenziato una netta azione inibitoria sull'attivazione del cofattore, determinata da un rallentamento nei tempi di clivaggio della giunzione A_1 — A_2 . Analisi focalizzate sulla catena pesante isolata del FVIII hanno dimostrato che il peptide impedisce totalmente il taglio della giunzione A_1 — A_2 , riducendo al contempo quello della giunzione A_2 —B. Grazie allo studio di molecole di FVIII mutanti (in cui i residui acidi raggruppati nella sequenza 337—372 sono stati sostituiti con alanina) sottoposte all'azione del FXa, si è dimostrato che la regione acida 337—372 posta tra i domini A_1 e A_2 , con particolare riferimento al cluster di amminoacidi acidi 361—363, definisce un sito d'interazione unico per il FXa sulla catena pesante del FVIII, fondamentale per l'aggancio (docking) dell'enzima durante l'attivazione del cofattore. L'interazione funzionale tra

le subunità A_1 e A_2 richiede la presenza di entrambe le regioni terminali di A_1 . L'estremità C-terminale di A_1 influenza inoltre la K_m di legame del FX al complesso tenasico, rappresentando un fattore determinante per l'attività misurata nei saggi plasmatici. Nogami et al. ha inoltre evidenziato come il segmento acido 389—394 del dominio A_2 interagisca con la trombina attraverso il suo esosito di legame per l'eparina, favorendo il taglio in corrispondenza dell'Arg(740) nella fase di attivazione del procofattore. Il distacco dei domini A_2 è un prerequisito indispensabile per consentire la dissociazione del FVIII dal vWF. Tale passaggio risulta essenziale nel processo coagulativo, poiché l'ancoraggio del FVIII alle membrane fosfolipidiche e quello al vWF si escludono reciprocamente. In condizioni circolatorie, il vWF agevola il rilascio del FVIII nel torrente ematico, prolungandone significativamente l'emivita [124, 125, 126].

Il complesso formato dai domini A_3 — C_1 — C_2 agisce come un valido antagonista competitivo nell'interazione tra FVIIIa e FIXa. Nell'ambito dell'assemblaggio membrana-dipendente, un apporto determinante all'affinità interproteica proviene tuttavia dalle altre subunità di FVIIIa. La subunità isolata A_2 presenta un'affinità ridotta verso FIXa; ciò nonostante, recenti modelli di simulazione evidenziano diversi amminoacidi potenzialmente coinvolti nel contatto con il dominio proteasico del FIXa. Entrambe le componenti, A_2 e A_3 — C_1 — C_2 , cooperano nel determinare l'affinità tra FVIIIa e FIXa all'interno del complesso tenasi di membrana.

I tagli inattivanti operati da FXa a livello dei residui Lys(36) e Arg(336) sono parzialmente coordinati dal modulo A_3 — C_1 — C_2 . In particolare, la scissione presso Lys(36) appare finemente regolata dal segmento acido al C-terminale del dominio A_1 , una regione in grado di associarsi a FXa mediante l'esosito per l'eparina. Diversi siti su FVIII consentono l'ancoraggio ad alta affini-

tà con la proteina correlata al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LRP), tra cui la sequenza Glu(1811)—Lys(1818) contenuta nel dominio A₃. Questo dato indica che il legame di LRP al dominio A₃ sfrutta le medesime strutture coinvolte nell'assemblaggio di FVIII con FIXa.

Ruolo degli ioni

Per generare l'attività cofattoriale del fattore VIII è indispensabile la presenza di cationi bivalenti, quali Ca²⁺ o Mn²⁺. Gli esperimenti di ricostituzione condotti su subunità isolate del fattore VIIIa hanno messo in luce un sito di legame funzionale per il Ca²⁺ localizzato all'interno della subunità A₁. Attraverso l'impiego della calorimetria isoterma ad assorbimento (ITC), è stata dimostrata la presenza di almeno due siti per il Ca²⁺ dotati di affinità comparabile nella medesima subunità A₁. Sebbene l'interazione con il Ca²⁺ non sia un requisito strettamente necessario per le scissioni proteolitiche effettuate dalla trombina, essa si rivela imprescindibile per l'espletamento dell'attività coagulante. Diversi esperimenti di mutagenesi hanno permesso di evincere che il segmento compreso tra i residui 110 e 126 svolge un ruolo chiave nella coordinazione del Ca²⁺, fornendo residui specifici in grado di partecipare alla formazione di un sito parzialmente condiviso per il Mn²⁺; l'occupazione di almeno uno di tali siti è la condizione necessaria per il raggiungimento della massima efficienza cofattoriale [105].

Meccanismi di inattivazione

L'inattivazione fisiologica del fattore VIII avviene attraverso due processi complementari, mostrati dalla Figura 2.5: la sottoregolazione del cofattore attivo (FVIIIa) una volta generato e la rimozione del procofattore/cofattore dal circolo ematico. Per quanto riguarda il FVIIIa stesso, dominano due

meccanismi consolidati: la dissociazione spontanea del dominio A_2 e il taglio proteolitico da parte della proteina C attivata (APC), con un'ulteriore proteolisi mediata da FIXa, FXa e plasmina, il tutto modulato dalle interazioni del cofattore all'interno del complesso tenasi e dal fattore di von Willebrand (vWF) [120, 127].

- *Dissociazione spontanea del dominio A_2 .* Il meccanismo di inattivazione intrinseco principale è la perdita non proteolitica del dominio A_2 , che riduce l'emivita della proteina a circa 2 minuti. Dopo l'attivazione da parte della trombina, come spiegato precedentemente, il dominio A_2 è trattenuto solo debolmente da interazioni elettrostatiche con i domini A_1 e A_3 - C_1 - C_2 ; pertanto, il FVIIIa è una molecola intrinsecamente instabile che si degrada a mano a mano che il dominio A_2 si dissocia dall'eterotrimerico. Questa dissociazione è spontanea ed è la ragione principale per cui l'attività del cofattore va perduta nel giro di pochi minuti dall'attivazione, indipendentemente da qualsiasi proteasi [127]. La dissociazione di A_2 può essere rallentata quando il FVIIIa è impegnato nel complesso della tenasi intrinseca, in quanto il FIXa entra in contatto con i siti di legame sia sul dominio A_2 che su quello A_3 , stabilizzando transitoriamente il labile dominio A_2 . Studi recenti confermano che il legame con il FIXa stabilizza il dominio A_2 in vivo e, così facendo, sposta l'equilibrio dell'inattivazione verso la proteolisi mediata da APC [120]. Le varianti ingegnerizzate che stabilizzano A_2 (ad esempio mediante l'introduzione di un legame disolfuro A_2 - A_3 o mutazioni come D519V/E665V) prevengono la dissociazione spontanea e prolungano l'attività, evidenziando come la dissociazione di A_2 sia un vero e proprio evento fisiologico limitante la velocità del processo e indipendente dagli altri meccanismi di inattivazione [127].

- *Inattivazione proteolitica da parte di APC.* L'APC è considerata il principale inattivatore proteolitico fisiologico del FVIIIa, ed esplica la sua funzione in due siti con conseguenze distinte. Il taglio del dominio A₁ a livello della Arg336 rilascia il frammento acido a₁ ed è generalmente il taglio limitante la velocità nel FVIII integro; quest'operazione non è svolta esclusivamente dalla APC, ma anche dal FXa e dalla plasmina, che esercitano anche un altro taglio in coincidenza della Lysine36 del dominio A₁ [120]. Il solo taglio a livello di Arg336 non inattiva completamente il FVIIIa quando la dissociazione di A₂ è bloccata, indicando che agisce in sinergia con la perdita del dominio A₂ [127]. Il secondo taglio avviene nel dominio A₂ in corrispondenza di Arg562, e divide in due parti il dominio stesso eliminando il legame con il FIXa, contribuendo in modo sostanziale alla perdita della funzione di cofattore [120]. Il taglio a livello di Arg336 procede a una velocità circa 6 volte superiore rispetto a quello di Arg562; in presenza di entrambi i cofattori dell'APC la differenza si riduce a circa 2 volte, motivo per cui entrambi i tagli contribuiscono in modo significativo [127].
- *Cofattori di APC: proteina S e Fattore V.* L'inattivazione del FVIIIa mediata da APC è notevolmente potenziata dalla proteina S, che accelera l'inattivazione del FVIII purificato di circa nove volte, preferenziando il taglio a livello di Arg562. Il fattore V integro (nel suo ruolo di cofattore, distinto da quello procoagulante) potenzia ulteriormente entrambi i tagli in presenza della proteina S, favorendo ancora una volta quello di Arg562. L'effetto cofattoriale di FV su APC è stato scoperto in seguito alla scoperta del fattore V Leiden: la sua caratteristica mutazione da Arg a Gln nella posizione 506, impedisce non solo la sua inattivazione da parte di APC, ma blocca contemporaneamente anche

la sua attività cofattoriale nei confronti di APC che contribuisce all'inattivazione del FVIII. Questa sinergia rende il sistema APC–proteina S–fattore V un freno anticoagulante coordinato sull'attività della tenasi [127]. Per ultimo, è interessante riportare il riscontro di come la proteina S sia in grado di interferire con la funzione cofattoriale del FVIII anche in assenza di APC, una capacità che risulta potenziata quando la proteina S si trova in complesso con la sua proteina di trasporto, la proteina di legame al C4b (C4bp) [128].

- *Modulazione da parte del FIXa e del FX.* Le interazioni proteina-proteina del FVIIIa all'interno della tenasi ne modulano la suscettibilità all'APC. Studi condotti da Morris et al. [129] hanno dimostrato che quando il FVIIIa è saturo di FIXa, il dominio A₂ risulta stabile e la perdita di attività procoagulante è dovuta alla proteolisi operata da APC/PS. Al contrario, in assenza di FIXa, prevale la dissociazione del dominio A₂ e l'attività del FVIIIa viene persa rapidamente, in modo pressoché indipendente da APC/PS. Inoltre, sia il FIXa che il FX possono proteggere specifici siti di taglio dell'APC sul FVIII: il FIXa protegge Arg562 e il FX protegge Arg336, sebbene questa protezione sia incompleta *in vivo*. Questo è dato dal fatto che l'effetto del FIXa risulta totale nei confronti dell'attività enzimatica di PS, ma solo parziale nei confronti di quella di APC/PS; concetto simile per il FX, la cui concentrazione plasmatica fisiologica non permette un'inibizione completa di APC. Osservazione importante è che, poiché il legame con il FIXa stabilizza A₂ e al contempo aumenta il contributo della proteolisi da parte dell'APC, la dissociazione spontanea e il taglio dell'APC funzionano come vie di sottoregolazione interdipendenti, piuttosto che strettamente parallele. Lo stesso studio sull'emostasi sopra citato dimostra che stabilizzare A₂,

bloccare il taglio dell'APC, o fare entrambe le cose insieme, migliora la potenza enzimatica del FVIII fino a oltre 10 volte, confermando che entrambi i meccanismi operano *in vivo* [129].

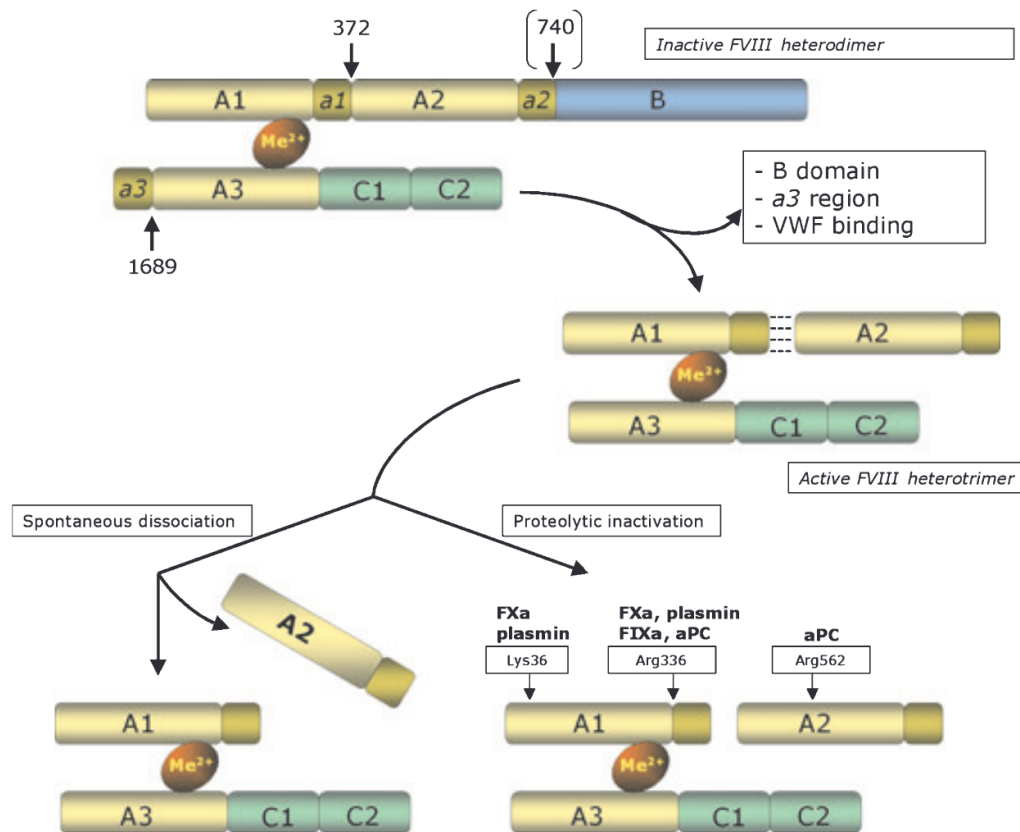


Figura 2.5: Processo di inattivazione del FVIII. L'attivazione del FVIII da parte della trombina determina il rilascio del dominio B e della regione a3, dando origine a una proteina eterotrimerica che ha perso il legame ad alta affinità con il vWF. L'eterotrimerico attivo viene successivamente inattivato attraverso diverse vie, che comprendono la dissociazione spontanea e/o l'inattivazione proteolitica [120].

Scopo dello studio

L'aumento persistente dei livelli plasmatici del fattore VIII (FVIII) rappresenta un importante fattore di rischio per lo sviluppo di eventi tromboembolici venosi. Sebbene l'incremento dell'attività del FVIII possa essere determinato da molteplici condizioni acquisite e da varianti genetiche, le alterazioni del gene *F8* associate a un fenotipo trombofilico sono relativamente poco caratterizzate. In particolare, il ruolo di alterazioni strutturali del gene nel determinare un aumento dell'espressione e dell'attività del FVIII, e nel contribuire quindi alla predisposizione trombotica, rimane un ambito di interesse clinico e biologico.

Il presente studio nasce dall'identificazione, nell'ambito dell'approfondimento diagnostico di una paziente con episodi trombotici ricorrenti, di una nuova alterazione del gene *F8*, denominata *F8* Padova, caratterizzata da una duplicazione associata a livelli marcatamente elevati di FVIII [130]. La presenza di un quadro clinico compatibile con una predisposizione trombotica e la successiva identificazione della medesima alterazione in altri membri della famiglia hanno fornito l'opportunità di studiare la relazione tra la variante genetica, il fenotipo biochimico e le caratteristiche cliniche dei soggetti portatori.

Lo scopo principale di questo studio è pertanto caratterizzare sotto il profilo clinico, laboratoristico e genetico una nuova famiglia portatrice della dupli-

cazione *F8* Padova, valutandone la segregazione nelle diverse generazioni e la possibile associazione con un fenotipo trombofilico. Lo studio comprende la probanda e i familiari appartenenti a tre generazioni, classificati sulla base della presenza o dell'assenza dell'alterazione genetica, al fine di mettere in relazione il genotipo con i livelli plasmatici di FVIII, la storia clinica e i parametri globali dell'emostasi.

In particolare, gli obiettivi dello studio sono:

1. verificarne la presenza dell'alterazione di *F8* nella probanda e nei membri della famiglia mediante analisi di sequenza e ricerca di grandi riarrangiamenti, definendone la modalità di segregazione familiare;
2. valutare il fenotipo biochimico associato alla duplicazione, con particolare riferimento ai livelli di attività e di antigene del FVIII e agli altri principali parametri del sistema coagulativo, al fine di verificare l'associazione tra la presenza dell'alterazione genetica e l'aumento del FVIII;
3. descrivere il fenotipo clinico dei soggetti portatori e non portatori, con particolare attenzione alla presenza di precedenti episodi di TEV e agli eventuali ulteriori fattori di rischio trombotico, al fine di valutare la relazione tra la presenza della duplicazione e le manifestazioni cliniche osservate nella famiglia;
4. approfondire il fenotipo emostatico mediante test globali della coagulazione, utilizzando la tromboelastometria rotazionale (ROTEM) e aggregometria piastrinica, con l'obiettivo di valutare se l'aumento dei livelli di FVIII associato alla duplicazione si traduca in modificazioni funzionali dell'equilibrio emostatico compatibili con uno stato di ipercoagulabilità;

5. correlare i dati genetici, biochimici, funzionali e clinici, verificando la concordanza tra presenza della duplicazione, incremento del FVIII, alterazioni dei test globali dell'emostasi e storia trombotica individuale;
6. contestualizzare la nuova alterazione nel panorama delle varianti di *F8* associate a trombofilia, attraverso una revisione della letteratura, finalizzata a identificare le precedenti evidenze relative a varianti genetiche associate a incremento dei livelli o dell'attività del FVIII e a fenotipo trombotico, confrontandone le caratteristiche con quelle osservate nella famiglia oggetto dello studio.

Lo studio mira a contribuire alla definizione del rapporto tra duplicazione del gene *F8*, aumento del FVIII e predisposizione trombotica, fornendo una caratterizzazione integrata di una nuova famiglia e ampliando le conoscenze disponibili sulle alterazioni genetiche di *F8* potenzialmente associate a trombofilia. Considerata la natura familiare, descrittiva ed esplorativa dello studio e la limitata numerosità della casistica, l'interpretazione dei risultati funzionali è orientata prevalentemente alla descrizione dei fenomeni osservati e alla generazione di ipotesi da verificare in popolazioni più ampie.

Materiali e metodi

4.1 Disegno dello studio

Il presente lavoro consiste in uno studio descrittivo di una famiglia (a cui ci si riferirà da qui in poi come «famiglia S») comprendente la probanda e i suoi familiari appartenenti, finalizzato alla caratterizzazione clinica, laboratoristica e genetica di una nuova alterazione del gene *F8*, denominata *F8* Padova, associata a livelli marcatamente aumentati di fattore VIII (FVIII) e a un fenotipo trombotico. Lo studio è stato condotto presso l'Azienda Ospedale-Università Padova. Il periodo di arruolamento è stato compreso tra settembre 2025 e maggio 2026. Oltre alla caratterizzazione clinica, biochimica e genetica, il fenotipo emostatico dei soggetti è stato approfondito mediante test globali della coagulazione, comprendenti tromboelastometria rotazionale (ROTEM) e aggregometria piastrinica, allo scopo di valutare l'impatto funzionale dell'alterazione di *F8* sull'equilibrio emostatico.

4.2 Popolazione dello studio

La probanda e i membri della famiglia sono stati arruolati presso l'Azienda Ospedale-Università Padova. Tutti i partecipanti hanno fornito consenso in-

formato scritto alla partecipazione allo studio, condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki. La probanda è stata sottoposta ad approfondimento trombofilico in seguito a ricorrenti episodi trombotici idiopatici, in presenza di test coagulativi di screening per le comuni trombofilie ereditarie ed acquisite nella norma. Sono stati successivamente studiati i familiari appartenenti a tre generazioni, per un totale di 9 soggetti. La prima generazione comprende la madre della probanda (mutazione *X-linked*); la seconda generazione comprende i fratelli e le sorelle della probanda; la terza generazione comprende i figli della probanda, della sorella germana e del fratello unilaterale. Ai fini dell'analisi familiare, i soggetti sono stati classificati sulla base della presenza o assenza dell'alterazione genetica identificata nella probanda (*carrier* e *non-carrier*). Il fenotipo biochimico è stato valutato separatamente sulla base dei livelli plasmatici di FVIII, considerando come intervallo di riferimento del laboratorio un'attività del FVIII pari al 60-160%.

4.3 Prelievi e test coagulativi

I campioni di sangue sono stati raccolti tramite prelievo venoso periferico con tubi tipo *vacutainer*, contenenti 0.109 mol/L di citrato di sodio. Il tempo di protrombina e il tempo di tromboplastina parziale attivata sono stati determinati con uno strumento BCS-XP (Siemens, Milano, Italia) usando Thromborel S (Siemens) e Actin FS (Siemens), rispettivamente. L'attività dei fattori procoagulanti II, VIII, IX, X e XI e del fibrinogeno, degli inibitori della coagulazione antitrombina, proteina C e proteina S è stata determinata tramite metodica standard [131, 132]. I livelli plasmatici di antigeni proteina C e proteina S sono stati valutati con metodo ELISA [133]. L'attività e i livelli di fattore di von Willebrand sono stati determinati attraverso

chemiluminescenza con lo strumento ACL Acu-Star [134]. Gli anticorpi antifosfolipidi sono stati indagati tramite ELISA [135]. L'omocisteina è stata misurata con metodica standard. L'aggregazione piastrinica su sangue intero è stata valutata attraverso il Multiplate Analyzer (Roche, Basilea, Svizzera) [136].

4.4 Tromboelastometria rotazionale

La valutazione globale delle proprietà viscoelastiche del coagulo è stata effettuata su sangue intero mediante ROTEM Sigma (Werfen, Bedford, MA, USA). Sono stati eseguiti i test FIBTEM, EXTEM, INTEM, APTEM secondo le indicazioni del produttore. Per ciascun test sono stati considerati i principali parametri tromboelastometrici, comprendenti *clotting time (CT)*, *clot formation time (CFT)* e *maximum clot firmness (MCF)*. I parametri ottenuti sono stati confrontati tra i membri della famiglia portatori e non portatori dell'alterazione di *F8*, allo scopo di identificare eventuali modificazioni compatibili con un fenotipo ipercoagulabile.

4.5 Ricerca della mutazione *F8* Padova

Lo screening di grandi riarrangiamenti del gene *F8* è stato condotto mediante analisi MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) utilizzando il kit SALSA P178 (MRC-Holland, Amsterdam, Paesi Bassi), il quale comprende almeno 1 sonda per ciascun esone di *F8* e 10 sonde di riferimento dirette verso altri geni del cromosoma X, i cui dettagli sono riportati nella Tabella 4.1. I profili di picco derivati dall'elettroforesi capillare delle sonde amplificate sono stati elaborati tramite il software di analisi Coffalyser con

i parametri predefiniti. L'altezza del picco di ogni sonda specifica per *F8* è stata normalizzata rispetto all'altezza media dei picchi di tutte le sonde di controllo. Un rapporto di picco di circa 1,0 attesta la presenza dell'esone di *F8* in un numero di copie normale (ovvero 1 copia nei maschi e 2 copie nelle femmine), mentre valori di circa 2,0 (nei maschi) e circa 1,5 (nelle femmine) sono indicativi di una duplicazione. Per confermare la presenza della duplicazione, il DNA genomico è stato estratto dai leucociti del sangue periferico mediante l'estrattore automatico di acidi nucleici Mag Core. Il DNA è stato amplificato a partire da 100 ng di DNA genomico mediante PCR, utilizzando la polimerasi AmpliTaq (Promega) in un termociclatore (2400 Perkin Elmer). Le sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento erano le seguenti:

- For-EIF8: 5'-GGATGCAGAGATGACAGCTGACAC-3' T_m 59.6
- Rev: 5'-GGGTTCTCCAATGAAACAGATCCGTG-3' T_m 59.6

Questa coppia di primer amplifica un frammento di 2.129 paia di basi, costituito dalla precisa regione di giunzione (*breakpoint junction*) tra l'estremità 3' terminale di parte dell'introne 1 a monte e l'estremità 5' iniziale del promotore a valle (Figura 5.10), che si genera esclusivamente in presenza della duplicazione. Prima del sequenziamento, i prodotti di PCR sono stati purificati mediante reazione enzimatica con esonucleasi e fosfatasi, al fine di rimuovere i deossiribonucleotidi trifosfato residui e i primer non incorporati. I frammenti amplificati sono stati quindi sequenziati mediante il metodo dei dideossinucleotidi (metodo di Sanger), utilizzando il Big Dye Terminator Sequencing Kit (versione 1.1; Applied Biosystems) sul sequenziatore SeqStudio (Applied Biosystems). I cromatogrammi sono stati analizzati mediante il software SeqMan Pro (Applied Biosystems, DNASTAR).

Tabella 4.1: Sonde organizzate secondo posizione nel cromosoma. Le lunghezze delle sonde possono variare leggermente a seconda delle impostazioni dello strumento di elettroforesi capillare. Si prega di consultare la scheda Coffalyser più aggiornata per le lunghezze esatte delle sonde ottenute presso MRC Holland. I numeri degli esoni di F8 derivano dal progetto MANE e si basano sul trascritto MANE Select. Per ulteriori informazioni, consultare il documento sulle sequenze delle sonde disponibile nella pagina del prodotto all'indirizzo www.mrcholland.com. Le bande cromosomiche si basano su: hg18.

Chr. Position	Target	Exon	Distance to next probe	Lenght (nt)	Probe number
Xq28	F8	Exon 26	1.5 kb	229	05641-L05091
Xq28	F8	Exon 26	22.8 kb	468	13708-L15182
Xq28	F8	Exon 25	1.3 kb	418	13707-L15181
Xq28	F8	Exon 24	1.4 kb	372	14164-L15766
Xq28	F8	Exon 23	32.9 kb	328	05637-L05087
Xq28	F8	Exon 22	3.8 kb	391	07045-L05898
Xq28	F8	Exon 21	1.5 kb	197	05634-L17547
Xq28	F8	Exon 20	0.7 kb	160	05633-L05083
Xq28	F8	Exon 19	1.9 kb	459	05632-L14950
Xq28	F8	Exon 18	0.5 kb	409	05631-L05081
Xq28	F8	Exon 17	0.5 kb	364	05630-L05080
Xq28	F8	Exon 16	1.6 kb	319	05629-L05079
Xq28	F8	Exon 15	22.3 kb	265	05628-L05078
Xq28	F8	Exon 14	1.5 kb	154	05627-L06055
Xq28	F8	Exon 14	0.9 kb	191	05626-L17546
Xq28	F8	Exon 14	16.5 kb	452	05625-L14949
Xq28	F8	Exon 13	6.1 kb	402	05624-L05074
Xq28	F8	Exon 12	0.1 kb	274	07044-L05899
Xq28	F8	Exon 12	3.1 kb	355	05623-L05893
Xq28	F8	Exon 11	4.1 kb	305	06287-L06058
Xq28	F8	Exon 10	4.9 kb	256	05621-L05071
Xq28	F8	Exon 9	0.6 kb	215	05620-L17549

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Chr. Position	Target	Exon	Distance to next probe	Lenght (nt)	Probe number
Xq28	F8	Exon 8	2.7 kb	179	05619-L14947
Xq28	F8	Exon 7	0.2 kb	148	05618-L05068
Xq28	F8	Exon 7	15.2 kb	247	05617-L05067
Xq28	F8	Exon 6	2.5 kb	186	06290-L17545
Xq28	F8	Exon 5	5.7 kb	221	06288-L05892
Xq28	F8	Exon 4	4.0 kb	298	05614-L05891
Xq28	F8	Exon 3	0.1 kb	313	06506-L06340
Xq28	F8	Exon 3	2.5 kb	444	05613-L14948
Xq28	F8	Exon 2	22.9 kb	172	05612-L05062
Xq28	F8	Exon 1	0.3 kb	209	05611-L17548
Xq28	F8	Exon 1		142	05610-L05060
Xp	Reference			166	04423-L05579
Xp	Reference			136	07103-L14743
Xp	Reference			292	02920-L02314
Xp	Reference			477	01391-L01039
Xp	Reference			426	13207-L14528
Xq	Reference			202	13203-L14524
Xq	Reference			434	13118-L15558
Xq	Reference			238	06910-L06490
Xq	Reference			382	02908-L02302
Xq	Reference			346	05125-L04515

4.6 Analisi di segregazione familiare della variante di *F8*

Una volta identificata l'alterazione di *F8* nella probanda, la sua presenza è stata ricercata nei membri della famiglia mediante PCR di conferma e MLPA. L'analisi ha consentito di studiare la segregazione dell'alterazione genetica all'interno delle tre generazioni della famiglia e di correlare il genotipo con i livelli di FVIII, il fenotipo clinico e i risultati dei test globali della coagulazione.

4.7 Revisione della letteratura sulle varianti di *F8* associate a trombofilia

Parallelamente allo studio familiare è stata condotta una revisione della letteratura finalizzata a identificare le varianti del gene *F8* associate a incremento dei livelli o dell'attività del FVIII e a fenotipo trombotico. La ricerca bibliografica è stata effettuata nel database PubMed, fino al 31 luglio 2026, utilizzando singolarmente e in combinazione i seguenti termini: “*F8*”, “*factor VIII*”, “*thrombophilia*”, “*venous thromboembolism*”, “*elevated factor VIII*”, “*gain of function*”, “*gene duplication*” e “*FVIII Padua/Padova*”. Sono stati considerati eleggibili gli studi che descrivevano alterazioni genetiche di *F8* associate a un incremento dei livelli antigenici e/o dell'attività plasmatica del FVIII e per le quali fossero disponibili informazioni sul fenotipo clinico, con particolare riferimento alle manifestazioni trombotiche. Sono state escluse le varianti associate esclusivamente a fenotipo emorragico e le varianti generate o caratterizzate esclusivamente mediante modelli *in silico*, in assenza di

evidenza clinica o funzionale. Per ciascuna variante identificata sono stati raccolti, ove disponibili, il tipo e la localizzazione dell'alterazione genetica, i livelli di FVIII, le caratteristiche cliniche dei soggetti portatori, la presenza di eventi trombotici e le eventuali analisi funzionali riportate.

4.8 Analisi statistica

Le variabili continue sono state descritte mediante media e deviazione standard o mediana e intervallo interquartile, in base alla distribuzione dei dati, mentre le variabili categoriche sono state espresse come numero e percentuale. Visto il campione ridotto di soli 9 individui, un confronto *carrier/non-carrier* mediante *t-test* non è stato eseguito per i seguenti problemi indipendenti:

1. Le assunzioni di normalità e di omogeneità delle varianze non sono verificabili con gruppi così piccoli, e il *t-test* è la scelta meno robusta fra quelle disponibili quando ciò accade.
2. I soggetti sono membri della stessa famiglia — condividono in parte il fondo genetico, l'ambiente e, per molti, anche il laboratorio e il periodo di prelievo — violando l'assunzione di indipendenza su cui il *t-test* (come qualunque test citato in questo capitolo) si fonda; una correzione di Welch per varianze diseguali non risolverebbe questo secondo problema, che riguarda la struttura di dipendenza dei dati, non la loro varianza.

Risultati

5.1 Descrizione della famiglia

5.1.1 Storia clinica e risultati di laboratorio

Probanda (II-2)

- *Anamnesi fisiologica.* La probanda è una donna di 50 anni d'età (PII-2 Figura 5.11), di 63 kg di peso corporeo e BMI 27.7 kg/m². Ha assunto contraccettivi orali ormonali da giovane, sospesi all'età di 17 anni in seguito ad un episodio di trombosi venosa profonda. Riferisce una gravidanza gemellare a termine con parto cesareo e nega aborti. Nega l'abitudine tabagica.
- *Anamnesi familiare.* La madre ha avuto episodi trombotici recidivanti idiopatici, il primo a 59 anni; la sorella germana ha avuto un episodio di trombosi dell'arto superiore in seguito a fattore di rischio minore; il fratello unilaterale ha avuto episodi trombotici recidivanti a partire dalla giovane età.
- *Anamnesi Patologica Remota.*

- All'età di 17 anni (anno 1992) sviluppò una trombosi venosa profonda in sede iliaco-femorale (poplitea) sinistra, in corso di terapia con estroprogestinici da 6 mesi. Tale episodio è stato trattato con warfarin per 12 mesi e poi sospeso.
- All'età di 25 anni (anno 2000) presentò una recidiva di TVP distale sinistra durante il *post-partum*, trattata con eparina per 7 mesi e poi sospesa.
- All'età di 48 anni (anno 2023) riportò algie all'arto inferiore sinistro, che vennero poi attribuite ad una sindrome post-trombotica, per la quale venne sottoposta a posizionamento di uno stent iliaco venoso sinistro. Nello stesso anno eseguì uno studio coagulativo che esclude la presenza di trombofilia ereditaria, anticorpi antifosfolipidi e iperomocisteina.
- All'età di 49 anni (anno 2024) si riscontrò una trombosi intra-stent iliaca sinistra, trattata in acuto con enoxaparina, poi con warfarin che protrasse fino all'esecuzione degli esami specifici nel nostro centro. L'EcoDoppler venoso di controllo effettuato nell'ottobre del 2024 mostrò una modesta apposizione trombotica parietale eccentrica non occludente nel segmento distale dello stent, insieme a un minimo ispessimento della vena poplitea omolaterale.

Alla visita specialistica presso il nostro ambulatorio di malattie trombotiche-emorragiche nel febbraio del 2025, la paziente mostrò evidenti reticoli venosi a livello del piede sinistro e della gamba sinistra, la presenza di una varice pelvica e l'assenza di edemi. Dati questi riscontri e la storia clinica, la paziente venne invitata a eseguire uno studio coagulativo completo, per il quale venne sospesa la terapia a base di warfarin per 48 ore e sostituita con

Edoxaban 60 mg 1 compressa al giorno, terapia tutt'ora in atto.

Le Tabelle 5.1 e 5.2 riportano i dati del profilo coagulativo eseguito sulla probanda nel marzo del 2025. Dagli esami emersero un allungamento del PT e dell'INR, probabilmente dovuto alla terapia anticoagulante in atto, un aumento marcato dell'attività del fattore VIII e, più lieve, dell'attività del fattore XI. Si evidenziò inoltre una riduzione dei livelli di fattore II, IX, X, di proteina C e proteina S (sia attività che antigene per entrambe queste ultime due), sempre compatibilmente con la terapia anticoagulante in atto. Infine, dall'emocromo e dal profilo lipidico emersero emoglobina nella norma e un moderato aumento del colesterolo LDL a 146 mg/dl. Si decise dunque di ripetere i soli esami alterati in seguito alla sospensione completa della terapia anticoagulante, e di studiare i familiari disponibili per il fattore VIII e per la proteina S. Nel maggio del 2025 la paziente venne rivista per discutere i risultati degli esami.

Successivamente, nel giugno dello stesso anno vennero ripetuti gli esami precedentemente alterati. Come si evince dalla Tabella 5.3, si riscontrò nuovamente un importante aumento dell'attività del fattore VIII. Inoltre, la paziente segnalò ipermenorrea e menorragia dall'inizio della terapia con Edoxaban, a cui venne associata un'anemia sideropenica agli esami ematochimici di luglio 2025 motivo per cui si decise di ridurre il dosaggio a 30 mg al giorno, con progressivo miglioramento della sintomatologia.

Pochi mesi dopo venne sottoposta a endoflebectomia femorale sinistra per ostruzione trombotica invalicabile dello stent iliaco, con apposizione di *patch* per esteso danno post-trombotico endoluminale del segmento femorale; in seguito all'intervento si consigliò stretto follow-up con EcoDoppler venoso agli arti inferiori e con pletismografia venosa. Nel novembre del 2025 venne rivalutata presso il nostro ambulatorio, dove venne sottoposta ad ulteriori

indagini, quali la tromboelastometria e l'aggregometria piastrinica, visualizzabili nelle Figure 5.1 e 5.2. Entrambi gli esami risultarono nei limiti di norma. Infine, nel dicembre dello stesso anno vennero rivalutati i test coagulativi, con particolare aggiunta del fattore VIII antigene e dell'analisi del vWF. Questi ultimi esami, invece, mostrarono alterazioni rispecchianti, ancora una volta, un'iperattività del FVIII, come mostra la Tabella 5.4: accorciamento del PTT, marcato aumento dei livelli di attività e antigene del FVIII e lieve aumento dei livelli di attività e antigene del vWF.

Lo studio della paziente si concluse verso la fine del dicembre 2025 con la valutazione angiologica clinico strumentale all'arto inferiore sinistro, che evidenziò:

- esiti stabilizzati di pregressa trombosi delle vene gemellari mediali e della vena poplitea, con segni di buona ricanalizzazione e persistenza di piccoli residui trombotici endoluminali (2.1 mm a livello gemellare, 3.3 mm a livello popliteo), cui si associa moderato reflusso venoso profondo durante la manovra di Valsalva;
- vene tibiali posteriori, peroneali, femorale superficiale e femorale comune attualmente pervie, comprimibili e senza segni di trombi endoluminali;
- occlusione dello stent venoso a livello iliaco esterno prossimale (appare occluso un tratto di circa 8 cm), mentre a livello distale si apprezza una iniziale ricanalizzazione; circoli collaterali rappresentati ed alimentati dalla vena epigastrica superficiale fungono da circolo di scarico del deflusso venoso profondo e formano varici sovrapubiche a livello distale, mentre a livello prossimale scaricano in vena iliaca comune;
- assenza di varici a livello vulvare e del plesso emorroidario;

- presenza di un linfocele "a clessidra" di discrete dimensioni a cavallo del legamento inguinale; la sacca sovralinguinale presentò un contenuto denso ed ipoecogeno, mentre la sacca sottolinguinale presentò un contenuto più liquido anecogeno.

Alla luce della diagnosi di trombofilia ereditaria con sindrome post-trombotica severa e stent iliaco, veniva deciso di aumentare la terapia anticoagulante con Edoxaban a 60 mg/die, tutt'ora in corso.

Tabella 5.1: Profilo coagulativo completo PII-2 (09/03/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	34.0	%	70.0 – 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	2.23		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	26.7	sec	22.8 – 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	30.7	%	80.0 – 120.0
Fattore VIII attività	482.9	%	60.0 – 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore IX attività	38.5	%	80.0 – 120.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore X attività	10.8	%	80.0 – 120.0
Fattore XI attività	168.2	%	80.0 – 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	353.7	mg/dl	150.0 – 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	111.7	%	80 – 120
Proteina C attività coagulometrica	16.1	%	80 – 120
Proteina C attività cromogenica	55.9	%	70 – 130
Proteina C antigene (ELISA)	73	%	80 – 120
Proteina S attività coagulometrica	34.2	%	70 – 130

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Proteina S antigene libera (ELISA)	26	%	60 – 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	57	%	80 – 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.12		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.04		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	108.9	%	75.0 – 140.0
PAI antigene	14.4	ng/ml	1.0 – 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.9	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	0.2	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	1.9	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.6	U/ml	< 10
aPTT-LA	32.9	sec	32.0 – 43.0
dRVVT ratio	1.09		< 1.3

Tabella 5.2: Enzimi ed isoenzimi PII-2 (19/02/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
P-OMOCISTEINA	13.74	μmol/L	0.00 – 15.00

Tabella 5.3: Esami di controllo PII-2 (08/06/2025)

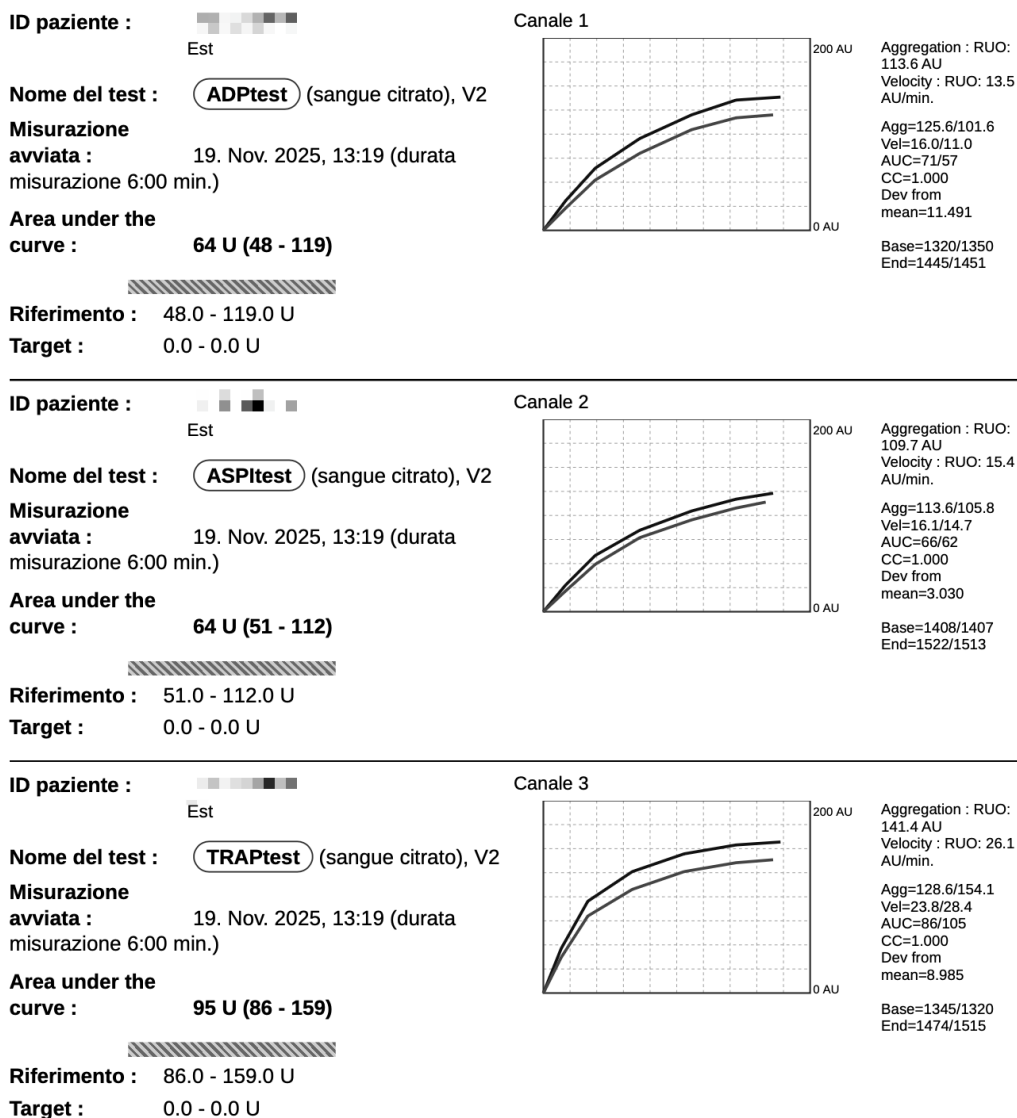
Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	112.2	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	0.98		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	23.2	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore VIII attività (Metodo: aPTT one stage)	364.6	%	60.0 - 160.0
Inibitori della coagulazione			
Proteina S attività coagulometrica	122.2	%	70 - 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	90	%	60 - 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	130	%	80 - 120

Tabella 5.4: Esami di controllo PII-2 (08/12/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	103.6	%	70.0 – 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.03		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	21.6	sec	22.8 – 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore VIII attività (Metodo: aPTT one stage)	498.0	%	60.0 – 160.0
Antigene fattore VIII	468	%	80.0 – 120.0
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag) (Metodo: Chemiluminescenza)	183	%	52 – 178 48 – 157 Gruppo sanguigno 0 60 – 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo) (Metodo: Chemiluminescenza)	178	%	46 – 176 44 – 161 Gruppo sanguigno 0 54 – 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA) (Metodo: Chemiluminescenza)	213	%	50 – 181 47 – 171 Gruppo sanguigno 0 61 – 193 Gruppo sanguigno non-0

Figura 5.1: Aggregometria piastrinica MULTIPLATE PII-2 (19/11/2025)

Multiplate® platelet function analysis
MP 101477 Kunde

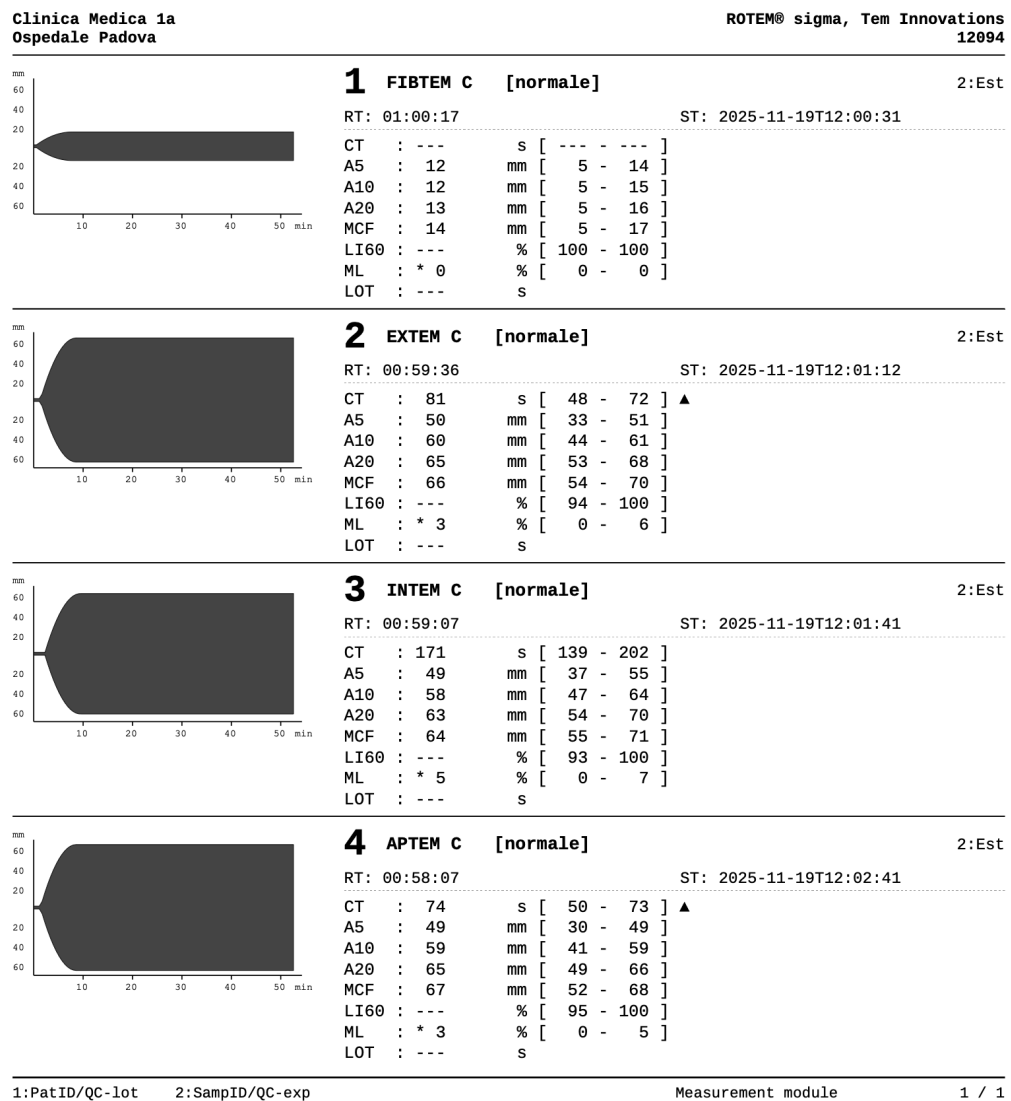


Temperatura unità di misurazione: 37.2°C. Rientra nel range specificato.

Fattori di correzione : 0.500; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000

Software Version: V2.04.40.01

Figura 5.2: Tromboelastometria ROTEM PII-2 (19/11/2025)



Paziente I-2

- *Anamnesi fisiologica.* La madre della probanda (I-2 Figura 5.11) è una donna di 83 anni d'età, 70 kg di peso corporeo e 158 cm di altezza (BMI 28,04 kg/m²). La paziente ha avuto un aborto spontaneo nelle prime settimane di gestazione, ma ha portato a termine quattro gravidanze con parto naturale. Nega tabagismo.
- *Anamnesi patologica remota.* Riferisce ipertensione arteriosa e lo sviluppo di irsutismo, per il quale ha assunto estroprogestinici per un breve periodo, poi sospesi per intolleranza. Riporta di essere stata sottoposta a tonsillectomia, appendicectomia e isterectomia totale.
 - Nell'anno 2002 (a 59 anni) ebbe un episodio di trombosi venosa profonda idiopatica, trattato in acuto con eparina e successivamente con warfarin per un anno.
 - Nell'anno 2010 sviluppò un'embolia polmonare definita idiopatica, trattata inizialmente con warfarin, il quale venne in seguito sostituito con Rivaroxaban 10 mg, terapia tutt'ora in atto.

Giunta alla nostra attenzione, nel gennaio 2026 la paziente venne sottoposta ai medesimi esami coagulativi generali della probanda, che evidenziarono anche in questo caso un ingente aumento dei livelli di attività e di antigene del FVIII, e un modesto aumento dell'attività del FIX, come visibile nella Tabella 5.5.

Tabella 5.5: Profilo coagulativo completo PI-2 (18/01/2026)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	94.8	%	70.0 – 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.05		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	25.3	sec	22.8 – 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	105.5	%	80.0 – 120.0
Fattore VIII attività	457.8	%	60.0 – 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore IX attività	157.8	%	80.0 – 120.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore X attività	82.8	%	80.0 – 120.0
Fattore XI attività	134.7	%	80.0 – 120.0
Antigene fattore VIII	465	%	80.0 – 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	351.4	mg/dl	150.0 – 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	102.4	%	80 – 120
Proteina C attività coagulometrica	84.6	%	80 – 120
Proteina C attività cromogenica	107.1	%	70 – 130
Proteina C antigene (ELISA)	120	%	80 – 120
Proteina S attività coagulometrica	147.7	%	70 – 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	89	%	60 – 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	119	%	80 – 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.03		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.01		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	110.2	%	75.0 – 140.0
PAI antigene	33.9	ng/ml	1.0 – 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.4	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	1.9	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	1.0	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.5	U/ml	< 10

Paziente II-4

- *Anamnesi fisiologica.* La sorella germana della probanda (PII-4 Figura 5.11) è una donna di 43 anni d'età, 103 kg di peso corporeo e 168 cm d'altezza (BMI 36,5 kg/m²). La paziente ha condotto una sola gravidanza a termine con parto cesareo, e ha subito un aborto spontaneo alla nona settimana di gestazione.
- *Anamnesi patologica remota.* Riferisce di aver assunto estroprogestinici per la durata di 6 mesi, prescritti per dismenorrea, di essere stata sottoposta a tonsillectomia e a terapia laser per disturbi alle cartilagini genicolate.
 - Nel 2022 (a 39 anni d'età) sviluppò una trombosi venosa profonda all'arto superiore sinistro durante la seconda giornata di infezione da SARS-CoV-2, trattata con eparina per 40 giorni.

Giunta alla nostra attenzione nel gennaio dell'anno 2026, la paziente venne sottoposta allo stesso studio coagulativo completo dei precedenti membri della famiglia. Dalle analisi, riportate in Tabella 5.6, emerse un accorciamento del PTT, un marcato aumento dei livelli di attività e di antigene di FVIII e una lieve riduzione dei livelli di attività coagulometrica della proteina C.

Tabella 5.6: Profilo coagulativo completo PII-4 (18/01/2026)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	101.7	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	0.99		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	20.2	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	110.3	%	80.0 - 120.0
Fattore VIII attività	498.0	%	60.0 - 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore X attività	101.2	%	80.0 - 120.0
Fattore XI attività	166.6	%	80.0 - 120.0
Antigene fattore VIII	550	%	80.0 - 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	380.8	mg/dl	150.0 - 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	93.1	%	80 - 120
Proteina C attività coagulometrica	78.5	%	80 - 120
Proteina C attività cromogenica	120.5	%	70 - 130
Proteina C antigene (ELISA)	123	%	80 - 120
Proteina S attività coagulometrica	122.6	%	70 - 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	107	%	60 - 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	128	%	80 - 120
Resistenza alla Proteina C attivata			

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.00		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.00		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	108.5	%	75.0 - 140.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	1.6	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	2.0	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	1.1	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.4	U/ml	< 10
dRVVT	34.3	sec	26.0 - 45.0
aPTT-LA	28.8	sec	32.0 - 43.0
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	134	%	52 - 178
(Metodo: Chemiluminescenza)			48 - 157 Gruppo sanguigno 0 60 - 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo)	146	%	46 - 176
(Metodo: Chemiluminescenza)			44 - 161 Gruppo sanguigno 0 54 - 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA)	151	%	50 - 181
(Metodo: Chemiluminescenza)			47 - 171 Gruppo sanguigno 0 61 - 193 Gruppo sanguigno non-0

Paziente II-6

- *Anamnesi fisiologica.* La sorella unilaterale della probanda (PII-6 Figura 5.11) è una donna di 57 anni d'età, di 80 kg di peso corporeo, BMI 26.7 kg/m², non fumatrice. Riferisce due gravidanze a termine con parto naturale e nega aborti.
- *Anamnesi patologica remota.* Risulta perlopiù muta; la paziente riporta di aver sofferto di osteopenia, ipertrigliceridemia in trattamento con acido folico (vitamina B₉) e acidi grassi ω_3 . Nega qualsiasi episodio di TEV.

Giunta alla nostra attenzione, la paziente è stata sottoposta alle stesse analisi coagulative complete, riportate in Tabella 5.7. Dalle indagini sono emersi un aumento dei livelli di attività e di antigene del FVIII, seppur inferiori rispetto ai precedenti familiari, un aumento dell'attività del FIX. Risultarono anche un aumento dei livelli di attività e di antigene della proteina C e un incremento lieve dei livelli di inibitore dell'attivato del plasminogeno (PAI).

Tabella 5.7: Profilo coagulativo completo PII-6 (14/12/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	116.1	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	0.94		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	24.6	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	94.5	%	80.0 - 120.0
Fattore VIII attività	201.3	%	60.0 - 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Fattore IX attività (Metodo: aPTT one stage)	130.8	%	80.0 - 120.0
Fattore X attività	107.2	%	80.0 - 120.0
Fattore XI attività	128.8	%	80.0 - 120.0
Antigene fattore VIII	175	%	80.0 - 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	241.0	mg/dl	150.0 - 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	107.1	%	80 - 120
Proteina C attività coagulometrica	129.6	%	80 - 120
Proteina C attività cromogenica	138.9	%	70 - 130
Proteina C antigene (ELISA)	142	%	80 - 120
Proteina S attività coagulometrica	82.7	%	70 - 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	61	%	60 - 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	117	%	80 - 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.00		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.00		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	101.9	%	75.0 - 140.0
PAI antigene	31.5	%	1.0 - 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.6	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	0.4	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	0.5	U/ml	< 10

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.8	U/ml	< 10
dRVVT	33.3	sec	26.0 - 45.0
aPTT-LA	33.6	sec	32.0 - 43.0
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	117	%	52 - 178
(Metodo: Chemiluminescenza)			48 - 157 Gruppo sanguigno 0 60 - 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo)	142	%	46 - 176
(Metodo: Chemiluminescenza)			44 - 161 Gruppo sanguigno 0 54 - 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA)	147	%	50 - 181
(Metodo: Chemiluminescenza)			47 - 171 Gruppo sanguigno 0 61 - 193 Gruppo sanguigno non-0

Paziente II-7

- *Anamnesi fisiologica.* Il fratello unilaterale della probanda (PII-7 Figura 5.11) è un uomo di 61 anni d'età, 110 kg di peso corporeo e 180 cm d'altezza (BMI 34 kg/m²).
- *Anamnesi patologica prossima.* Il paziente è affetto da ipertensione arteriosa.
 - Riporta di aver subito una trombosi venosa profonda all'età di 31 anni (anno 1996), trattata con Enoxaparina.
 - All'età di 33 anni (anno 1998) venne sottoposto a safenectomia, seguita poi da altri interventi sempre all'asse venoso di destra, tra cui il posizionamento di uno stent iliaco.

- Nell’anno 2015 sviluppò un’embolia polmonare definita idiopatica trattata con warfarin per 3 mesi, e Rivaroxaban a seguire, tutt’ora in atto. Giunto presso il nostro ambulatorio, il paziente venne indagato con profilo coagulativo completo, i cui risultati sono riportati in tabella 5.8. Da questi emerse un marcato aumento dei livelli di attività e di antigene de FVIII, compatibile con difetto trombofilico ereditario presente nella sorella e una riduzione «spuria» dell’attività coagulometrica della proteina C.

Tabella 5.8: Profilo coagulativo completo PII-7 (14/12/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	100.5	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.06		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	25.0	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	85.0	%	80.0 - 120.0
Fattore VIII attività (Metodo: aPTT one stage)	498.0	%	60.0 - 160.0
Fattore IX attività (Metodo: aPTT one stage)	133.1	%	80.0 - 120.0
Fattore X attività	97.7	%	80.0 - 120.0
Fattore XI attività	135.7	%	80.0 - 120.0
Antigene fattore VIII	515	%	80.0 - 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	298.2	mg/dl	150.0 - 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	102.5	%	80 - 120
Proteina C attività coagulometrica	69.1	%	80 - 120

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Proteina C attività cromogenica	99	%	70 - 130
Proteina C antigene (ELISA)	113	%	80 - 120
Proteina S attività coagulometrica	113.7	%	70 - 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	90	%	60 - 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	121	%	80 - 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.00		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.00		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	92.2	%	75.0 - 140.0
PAI antigene	14.9	%	1.0 - 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.6	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	0.5	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	0.6	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.7	U/ml	< 10
aPTT-LA	30.7	sec	32.0 - 43.0
dRVVT ratio	1.05	sec	< 1.3
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	124	%	52 - 178
(Metodo: Chemiluminescenza)			48 - 157 Gruppo sanguigno 0 60 - 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo)	137	%	46 - 176
(Metodo: Chemiluminescenza)			44 - 161 Gruppo sanguigno 0

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Attività di legame al collagene (vWF:CBA) (Metodo: Chemiluminescenza)	150	%	54 - 211 Gruppo sanguigno non-0
			50 - 181
			47 - 171 Gruppo sanguigno 0
			61 - 193 Gruppo sanguigno non-0

Pazienti III-1 e III-2

- *Anamnesi fisiologica.* I figli della probanda sono due maschi gemelli, entrambi di 25 anni d'età. Il paziente III-1 (Figura 5.11) pesa 79 kg ed è alto 178 cm (BMI 24.9 kg/m²), mentre il fratello III-2 (Figura 5.11) pesa 80 kg ed è alto 178 cm (BMI 25.2 kg/m²).
- *Anamnesi patologica prossima.* Il paziente III-1 è stato sottoposto ad adenoidectomia e ha subito una frattura al naso a 21 anni d'età (anno 2022). Entrambi i fratelli presentano una storia libera da qualsiasi evento di TEV.

Le analisi di laboratorio evidenziarono: valori normali di FVIII:C e valori all'estremo superiore di FVIII:Ag per PIII-1, e valori lievemente rialzati di FVIII:C e normali di FVIII:Ag per PIII-2. Considerata la possibile storia internistica negativa per via della giovane età, i pazienti vennero comunque sottoposti allo studio coagulativo completo, di cui si riportano i risultati nelle Tabelle 5.9 e 5.10.

Tabella 5.9: Profilo coagulativo completo PIII-1 (12/05/2026)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	102.2	%	70.0 – 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.07		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	25.4	sec	22.8 – 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	95.5	%	80.0 – 120.0
Fattore VIII attività	148.1	%	60.0 – 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore IX attività	92.7	%	80.0 – 120.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore X attività	102.5	%	80.0 – 120.0
Fattore XI attività	110.4	%	80.0 – 120.0
Antigene fattore VIII	121	%	80.0 – 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	211.9	mg/dl	150.0 – 450.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	119.4	%	80 – 120
Proteina C attività coagulometrica	84.3	%	80 – 120
Proteina C attività cromogenica	93.1	%	70 – 130
Proteina C antigene (ELISA)	89	%	80 – 120
Proteina S attività coagulometrica	132.9	%	70 – 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	136	%	60 – 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	136	%	80 – 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.02		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.07		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	97.1	%	75.0 – 140.0
PAI antigene	11.3	ng/ml	1.0 – 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.4	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	2.9	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	1.5	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	3.6	U/ml	< 10
dRVVT	37.3	sec	26.0 – 45.0
aPTT-LA	32.6	sec	32.0 – 43.0
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	99	%	52 – 178
(Metodo: Chemiluminescenza)			48 – 157 Gruppo sanguigno 0 60 – 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetico (vWF:RCo)	127	%	46 – 176
(Metodo: Chemiluminescenza)			44 – 161 Gruppo sanguigno 0 54 – 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA)	116	%	50 – 181
(Metodo: Chemiluminescenza)			47 – 171 Gruppo sanguigno 0 61 – 193 Gruppo sanguigno non-0

Tabella 5.10: Profilo coagulativo completo PIII-2 (27/05/2026)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT-attività protrombinica)	108.0	%	70,0 – 100,0

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Tempo di protrombina PT-INR	1.02		
Tempo di Tromboplastina Parziale PTT (BCS XP)	26.4	sec.	22,8 – 31,0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	106.0	%	80.0 – 120.0
Fattore VIII attività (F VIII:C)	184.5	%	60.0 – 160,0
Fattore von Willebrand antigene	109.0	%	52.2 – 177.9
FVW cofattore della ristocetina	150.0	%	46.6 – 176.3
Fattore IX attività	125.0	%	80.0 – 120.0
Fattore X attività	119.0	%	80,0 – 120.0
Fattore XI attività	126.0	%	80.0 – 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	209	mg/dl	150.0 – 450.0
CBA: Binding al collagene del von Willebrand	(in corso)		
Fattore VIII antigene	160.0	%	60.0 – 160.0
Inibitori della coagulazione			
Antitrombina attività cromogenica	114	%	80 – 120
Proteina S attività coagulometrica	152	%	70 – 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	145	%	80 – 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	133	%	80 – 120
Proteina C attività coagulometrica	82	%	80 – 120
Proteina C attività cromogenica	93	%	70 – 130
Proteina C antigene (ELISA)	94	%	80 – 120
Resistenza alla Proteina C Attivata			
APC sensitivity ratio	2.03		> 2
APC sensitivity ratio normalizzato	1.08		> 0,84
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante Protrombinica G20210A	Assente		

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-cardiolipina Ig G	0.9	U/ml	< 10
Anticorpi anti-cardiolipina Ig M	0.4	U/ml	< 10
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I Ig G	0.4	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I Ig M	0.7	U/ml	< 8
dRVVT	38.0	sec	26.0 – 45.0
aPTT-LA	35.0	sec	32.0 – 43.0
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	108.0	%	75.0 – 140.0
PAI antigene	17.0	ng/ml	1.0 – 25.0

Paziente III-3

Il paziente III-3 (Figura 5.11) è l'unico figlio, maschio, della paziente II-4, di 9 anni d'età, 52 kg di peso corporeo e 143 cm d'altezza (BMI 25.4 kg/m²). Nonostante l'anamnesi patologica prossima risulti muta, complice la giovane età, il paziente venne comunque sottoposto alle indagini laboratoristiche mostrate in Tabella 5.11, che evidenziarono il medesimo pattern di alterazione dei livelli di attività e di antigene del FVIII dei precedenti soggetti, quindi sempre compatibile con una trombofilia ereditaria. Infine, il paziente venne sottoposto alla valutazione della tromboelastometria e dell'aggregometria piastrinica, riportate nelle Figure 5.3 e 5.4.

Tabella 5.11: Profilo coagulativo di base PIII-3 (02/06/2026)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	95.9	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.12		

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	24.6	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore VIII attività	442.2	%	60.0 - 160.0
Antigene fattore VIII	350	%	80.0 - 120.0
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
<i>Mutazione fattore V Leiden</i>	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	90	%	52 - 178
<i>(Metodo: Chemiluminescenza)</i>			48 - 157 Gruppo sanguigno 0
			60 - 210 Gruppo sanguigno non-0
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo)	101	%	46 - 176
<i>(Metodo: Chemiluminescenza)</i>			44 - 161 Gruppo sanguigno 0
			54 - 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA)	100	%	50 - 181
<i>(Metodo: Chemiluminescenza)</i>			47 - 171 Gruppo sanguigno 0
			61 - 193 Gruppo sanguigno non-0

Figura 5.3: Aggregometria piastrinica MULTIPLATE PIII-3 (14/05/2026)

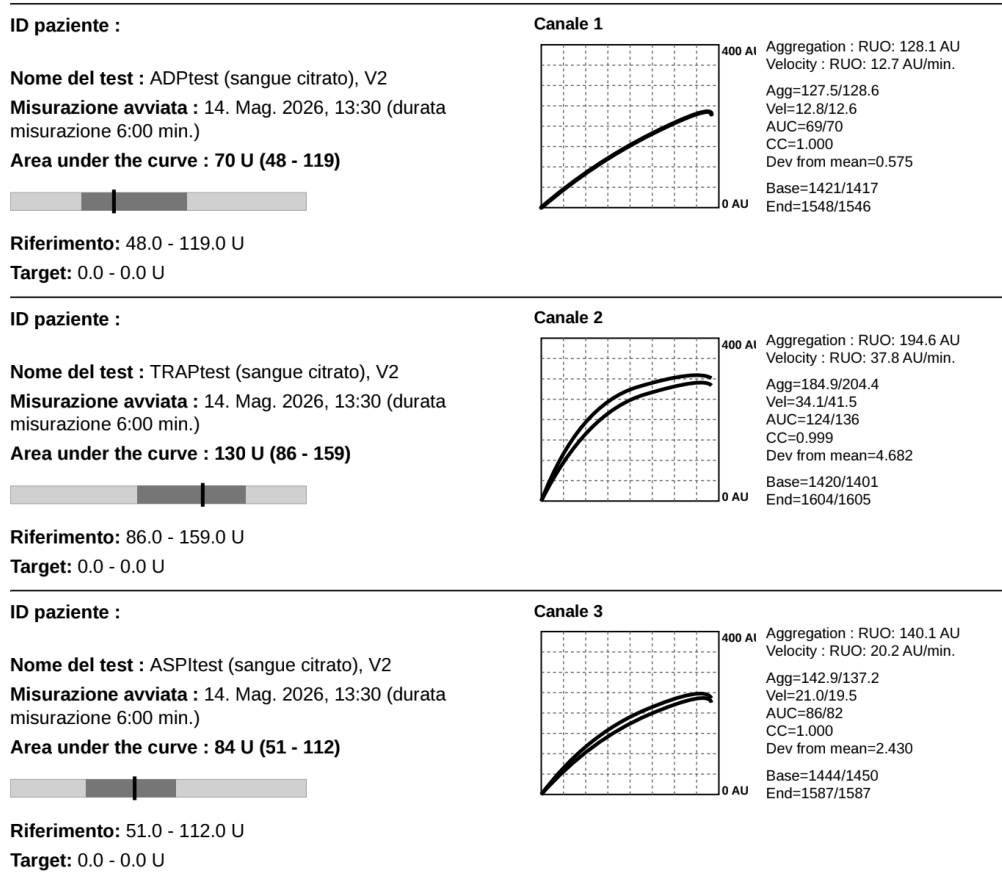
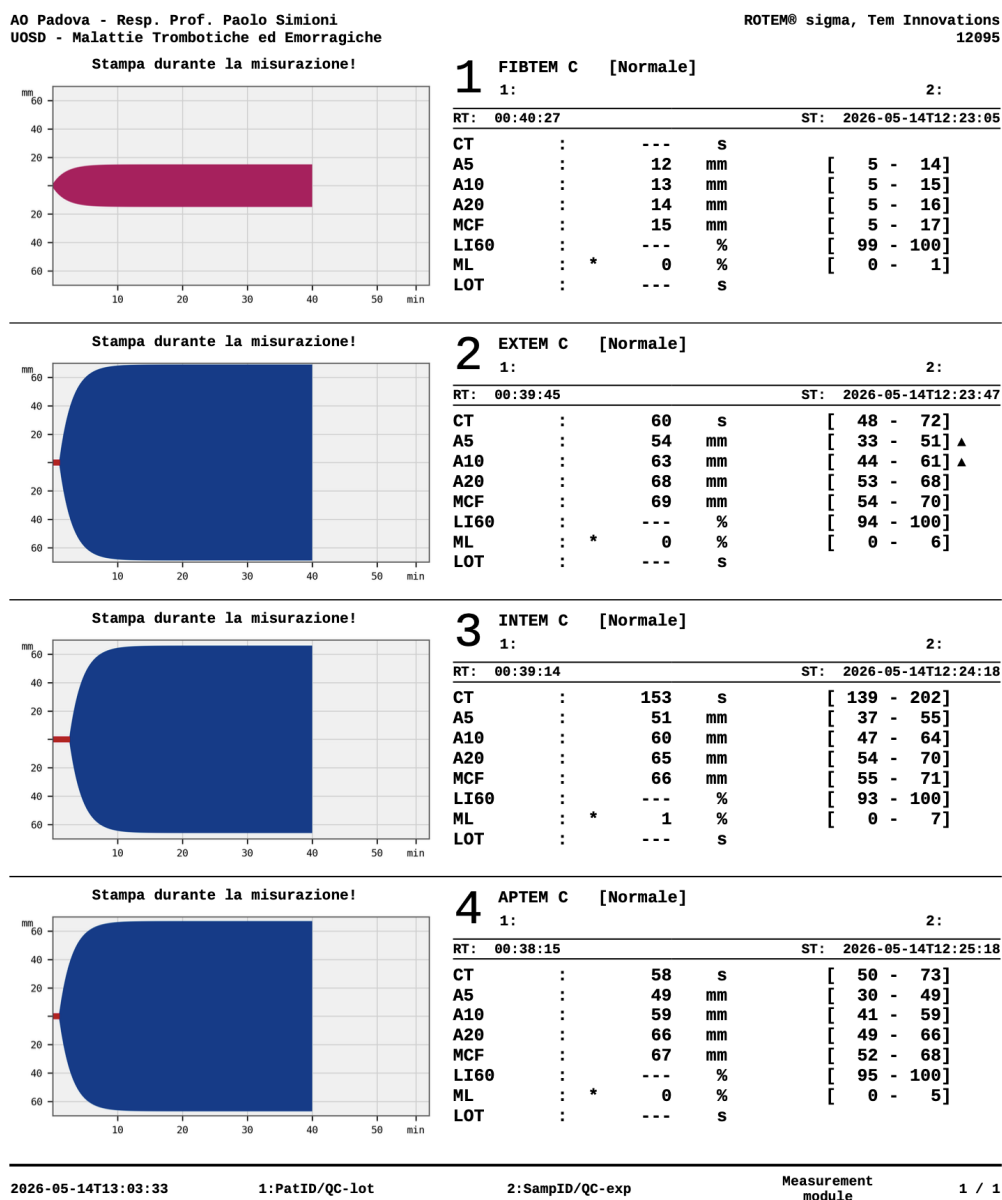


Figura 5.4: Tromboelastometria ROTEM PIII-3 (14/05/2026)



Paziente III-6 e III-7

I figli del paziente II-7 sono un maschio (PIII-6 Figura 5.11), che non venne sottoposto ad accertamenti, vista la localizzazione del gene *F8* sul cromosoma X, e una femmina (PIII-7 Figura 5.11) di 26 anni d'età, 70 kg di peso corporeo e 173 cm d'altezza (BMI 23.4 kg/m²). La paziente III-7 presenta anamnesi muta per eventi trombotici e altre condizioni rilevanti e assume contraccettivi ormonali estroprogestinici. Verso la fine dell'anno 2025 venne indagata con gli esami ematochimici (Tabella 5.12) e agli inizi del 2026 con gli studi di coagulazione trattati finora (Figure 5.5 e 5.6), dai quali risultò un aumento dei livelli di attività e antigene del FVIII. Sono state poi eseguite anche tromboelastometria e aggregometria piastrinica, risultate nella norma (Figure 5.5 e 5.6).

Tabella 5.12: Profilo coagulativo completo PIII-7 (14/12/2025)

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Test globali			
Tempo di protrombina (PT)	96.8	%	70.0 - 100.0
Tempo di protrombina (PT-INR)	1.03		
Tempo di tromboplastina parziale aPTT	24.8	sec	22.8 - 31.0
Fattori della coagulazione			
Fattore II attività	110.2	%	80.0 - 120.0
Fattore VIII attività	183.1	%	60.0 - 160.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore IX attività	110.2	%	80.0 - 120.0
<i>(Metodo: aPTT one stage)</i>			
Fattore X attività	113.9	%	80.0 - 120.0
Fattore XI attività	121.6	%	80.0 - 120.0
Antigene fattore VIII	220	%	80.0 - 120.0
Fibrinogeno secondo Clauss	281.0	mg/dl	150.0 - 450.0
Inibitori della coagulazione			

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

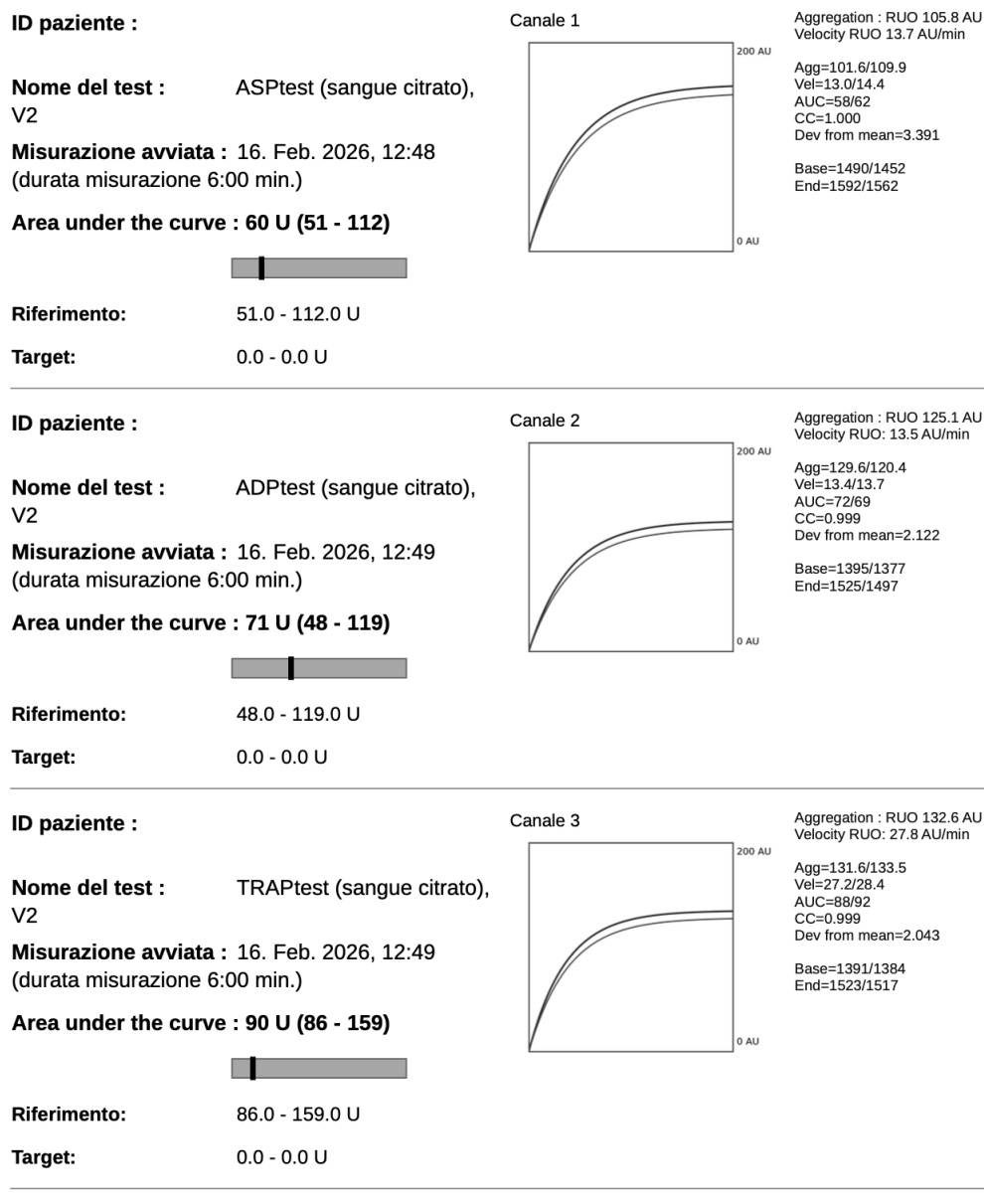
Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Antitrombina attività cromogenica	120.5	%	80 - 120
Proteina C attività coagulometrica	87.2	%	80 - 120
Proteina C attività cromogenica	119	%	70 - 130
Proteina C antigene (ELISA)	120	%	80 - 120
Proteina S attività coagulometrica	89.9	%	70 - 130
Proteina S antigene libera (ELISA)	86	%	60 - 120
Proteina S antigene totale (ELISA)	119	%	80 - 120
Resistenza alla Proteina C attivata			
APC sensitivity ratio (dil. 1+4)	2.00		> 2.00
APC sensitivity ratio normalization (dil. 1+4)	1.00		> 1.00
Analisi dei Polimorfismi (trombofilici)			
Mutazione fattore V Leiden	Assente		
Variante protrombinica G20210A	Assente		
Fibrinolisi			
Plasminogeno attività	101.3	%	75.0 - 140.0
PAI antigene	26.3	%	1.0 - 25.0
Anticorpi antifosfolipidi			
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgG	0.5	U/ml	< 8
Anticorpi anti-beta2-glicoproteina I IgM	2.0	U/ml	< 8
Anticorpi anti cardiolipina IgG	0.4	U/ml	< 10
Anticorpi anti cardiolipina IgM	0.1	U/ml	< 10
dRVVT	37.3	sec	26.0 - 45.0
aPTT-LA	29.7	sec	32.0 - 43.0
Fattore di von Willebrand			
Antigene (vWF:Ag)	79	%	52 - 178
(Metodo: Chemiluminescenza)			48 - 157 Gruppo sanguigno 0 60 - 210 Gruppo sanguigno non-0

continua nella pagina successiva

continua dalla pagina precedente

Esame	Risultato	Unità	Intervallo di riferimento
Attività del cofattore ristocetinico (vWF:RCo) (Metodo: Chemiluminescenza)	82	%	46 - 176 44 - 161 Gruppo sanguigno 0 54 - 211 Gruppo sanguigno non-0
Attività di legame al collagene (vWF:CBA) (Metodo: Chemiluminescenza)	89	%	50 - 181 47 - 171 Gruppo sanguigno 0 61 - 193 Gruppo sanguigno non-0

Figura 5.5: Aggregometria piastrinica MULTIPLATE PIII-7 (16/02/2026)

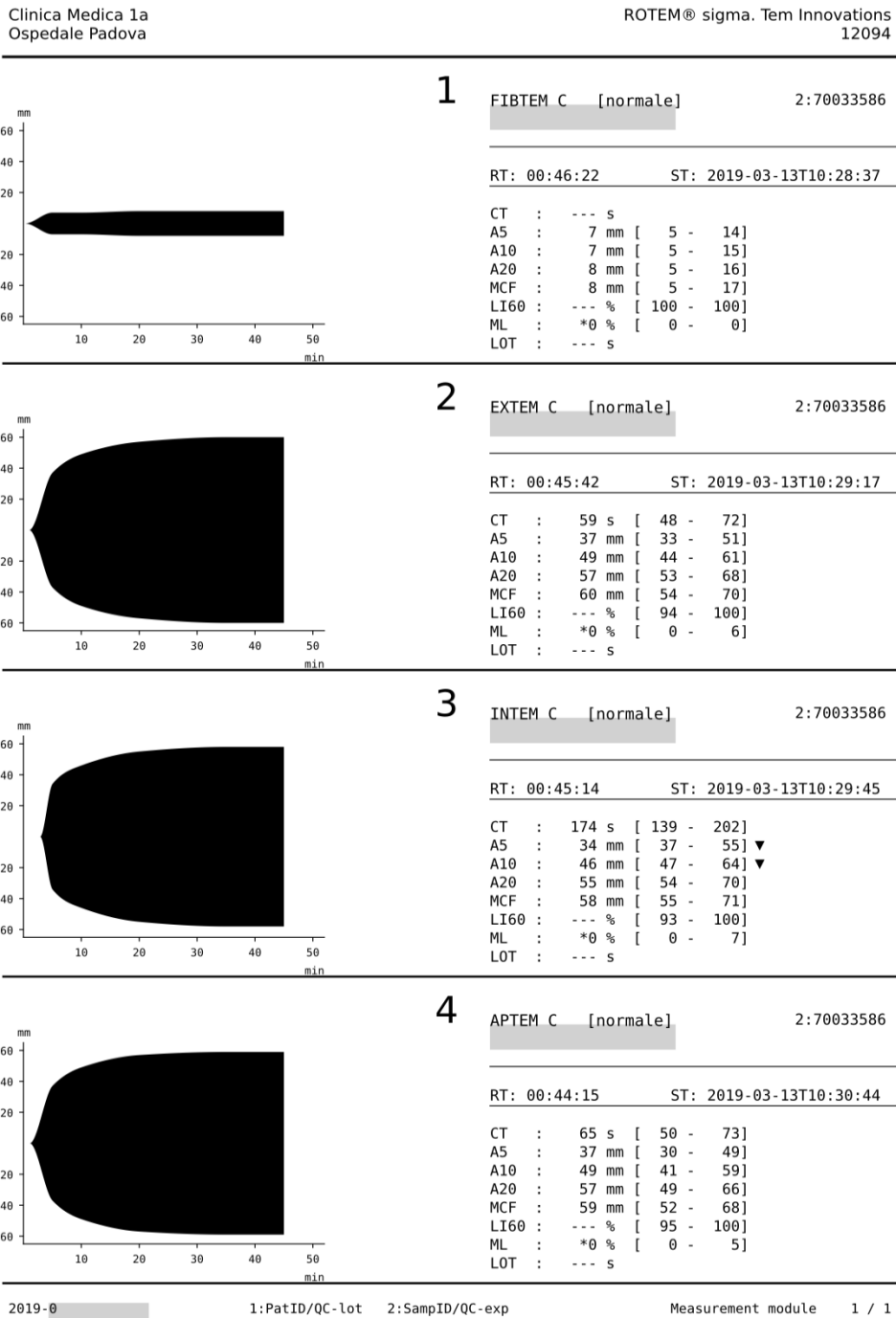


Temperatura unità di misurazione: 37.1°C. Rientra nel range specificato.

Fattori di correzione : 0.500; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000; 1.000

Software Version: V2.04.40.01

Figura 5.6: Tromboelastometria ROTEM PIII-7 (2019)



5.2 Indagini genetiche

La distribuzione di elevati livelli di attività e di antigene di FVIII nella famiglia S è risultata compatibile con una mutazione del gene *F8*, che ha un'ereditarietà X-*linked*. L'alterazione genetica sospettata è l'amplificazione parziale del gene *F8*, riscontrata e caratterizzata precedentemente da Simioni et al. (2021) [130]. Nello studio sopracitato, l'identificazione di *reads* dall'analisi NGS (*Next generation sequencing*) che mappavano simultaneamente sul promotore di *F8* e sulla porzione distale dell'introne 1, distanti diverse kb nella sequenza di riferimento, ha permesso di definire la configurazione genomica della duplicazione e di determinarne i confini a livello nucleotidico. La duplicazione si estende per 23.420 bp (ChX: 154.229.849-154.253.268) e comprende il promotore, l'esone 1 e quasi l'intero introne 1 del gene *F8*. Le due copie sono disposte in tandem senza DNA spaziatore e presentano il medesimo orientamento (Figura 5.10B). Questa configurazione genomica e il punto esatto di giunzione sono stati confermati mediante sequenziamento Sanger (Figura 5.10B). Entrambi i punti di rottura della duplicazione cadono all'interno di un elemento ripetitivo: un elemento LINE L2 (*long interspersed nuclear element*) per il punto di rottura nella regione del promotore, e un elemento SINE AluJo (*Short interspersed nuclear element*) e LINE L1MB2 per il punto di rottura a valle nell'introne 1. Inoltre, l'analisi della sequenza nucleotidica del punto di giunzione ha dimostrato che i 2 punti di rottura della duplicazione condividono un tratto identico di 7 nucleotidi (riquadro Figura 5.10), suggerendo che la duplicazione sia stata generata attraverso un meccanismo mediato da *microhomology*. Non sono state osservate ulteriori inserzioni o delezioni a nessuna delle due estremità della regione duplicata [130].

Per quanto riguarda la famiglia S, è stata condotta l'analisi MLPA nella probanda e nei membri della famiglia disponibili (I-2, II-2, II-4, II-6, II-7, III-2, III-3, III-7). L'indagine ha rivelato la presenza di una copia extra dell'esone 1 nei familiari con alti livelli di FVIII, mostrando che tali membri erano emizigoti (maschi: II-7, III-3) o eterozigoti (femmine: I-2, II-2, II-4, III-7) per la duplicazione dell'esone 1 di *F8*, mentre nessuno dei familiari con livelli normali di FVIII portava questa CNV (*copy number variation*). I soggetti PII-6 e PIII-2, invece, hanno riportato valori *borderline* o lievemente elevati di FVIII attività e/o di FVIII antigene, risultando però negativi per la duplicazione indagata. A titolo esemplificativo, si riportano il grafico ottenuto per un maschio portatore (PIII-3, Figura 5.8) e una femmina portatrice (la probanda, PII-2, Figura 5.9): come già anticipato nei materiali e metodi, l'eterozigosi nel cromosoma X risulta con rapporto di picco pari a 1,5 per le sonde leganti l'esone 1 di *F8*, e con un rapporto normale (uguale a 1) per tutte le sonde leganti gli altri esoni del gene e per le sonde di controllo. L'emizigosi, invece, risulta con un rapporto di picco di 2,0 per l'esone 1 e con un rapporto sempre pari a 1 per tutte le altre sonde. L'analisi MLPA, tuttavia, identifica la presenza di un'amplificazione genica, ma non dà indicazione sulla sua localizzazione. La conferma che la duplicazione fosse *F8* Padova è stata ottenuta mediante la PCR descritta nei materiali e metodi. Il prodotto della reazione è stato poi sottoposto a elettroforesi su gel, così da separare le bande per lunghezza ed evidenziare gli ampliconi specifici. Come mostra la Figura 5.7, i pazienti sani (senza alterazioni laboratoristiche, né clinica rilevante) presentano una sola banda, mentre per il soggetto PIII-3, sospetto portatore, appare una seconda banda data dallo specifico amplicone generato dalla PCR.

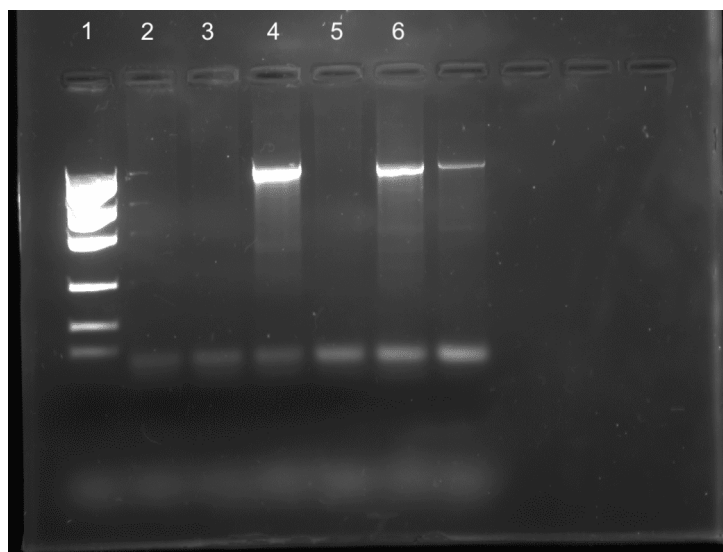


Figura 5.7: Corsa elettroforetica dell'amplificato di reazione PCR con i primer specifici per la duplicazione del *F8* Padova. In ordine, da sinistra a destra: 1) marker; 2) PIII-1 negativo; 3) PIII-2 negativo; 4) PIII-3 positivo; 5) controllo negativo; 6) Controllo positivo.

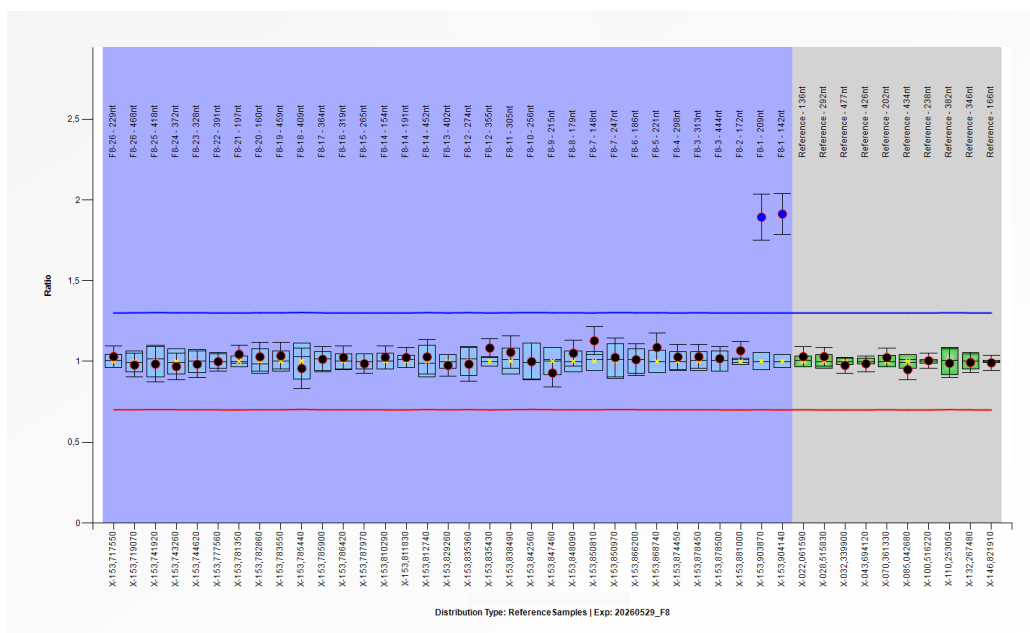


Figura 5.8: Analisi MLPA probanda (PIII-3, maschio): è visibile il rapporto di picco pari a 2 per le sole due sonde specifiche per l'esone 1 del gene *F8*.

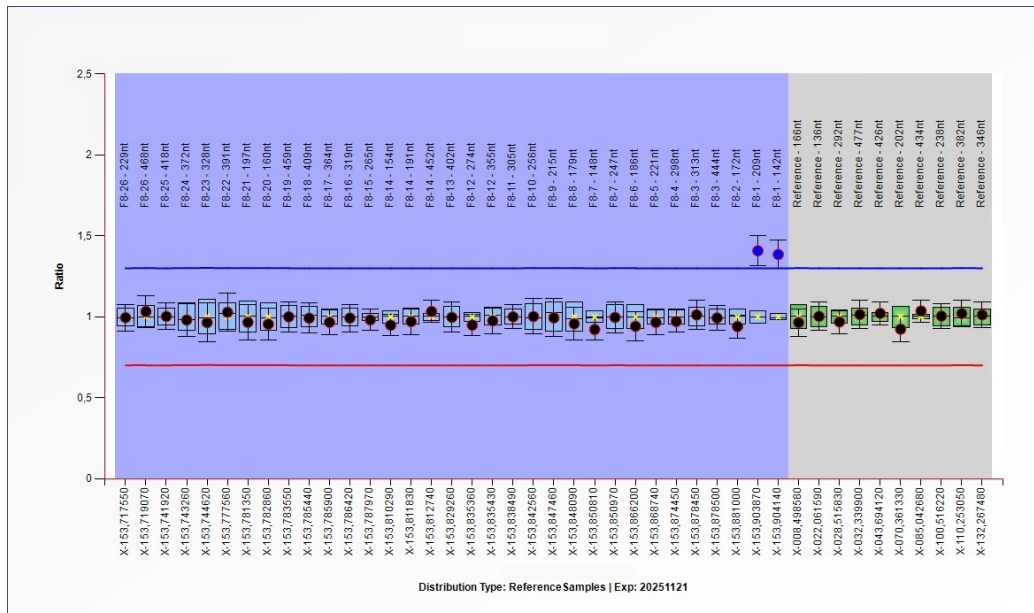


Figura 5.9: Analisi MLPA probanda (PII-2, femmina): è visibile il rapporto di picco pari a 1,5 per le sole due sonde specifiche per l'esone 1 del gene *F8*.

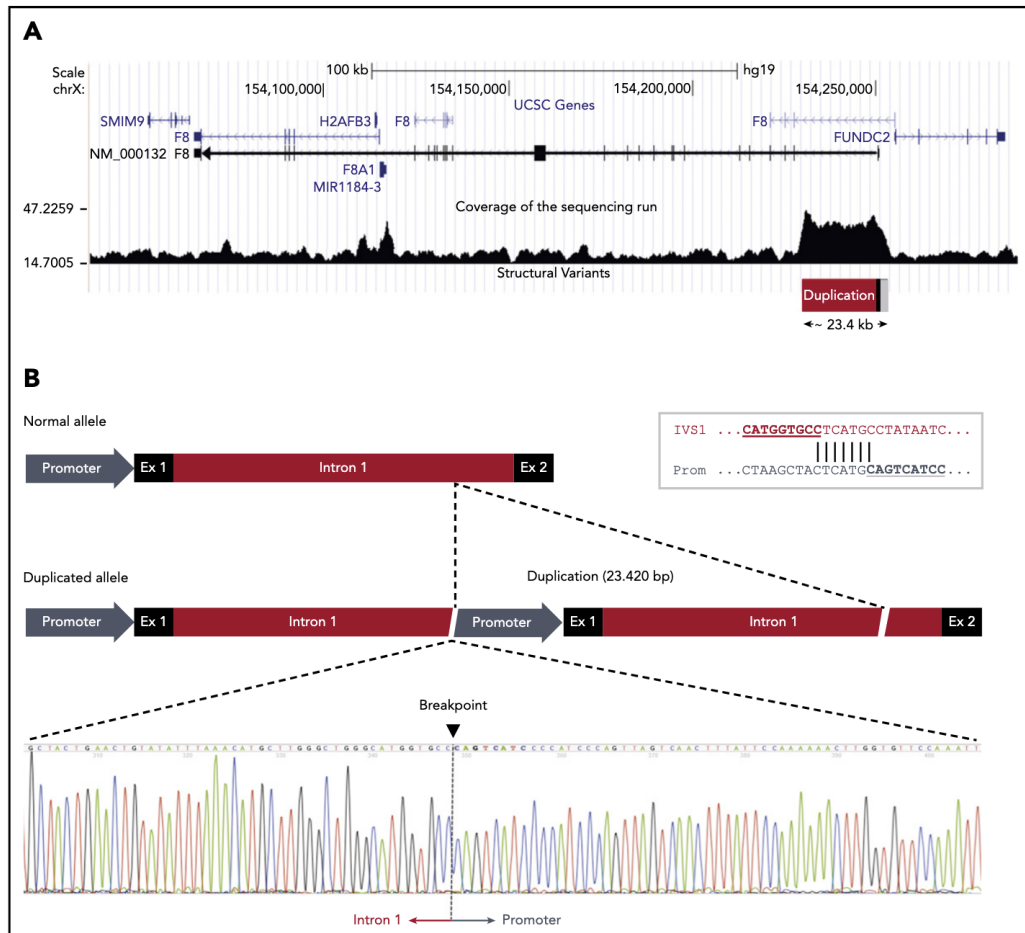


Figura 5.10: Descrizione della duplicazione *F8* Padova e mappatura dei rispettivi punti di rottura. (A) Regione genomica che comprende il gene *F8* secondo Genome Browser [137], orientato da sinistra a destra. La regione sequenziata è tracciata in basso. La regione duplicata è pari a ≈ 23.4 kb all'estremità 5' del trascritto di *F8* (NM_000132) è indicata a destra. (B) Confronto tra l'allele sano (in alto) e quello duplicato (in basso), sempre orientati da sinistra a destra. Il punto esatto di rottura (*breakpoint*) della duplicazione, dove l'introne 1 della copia a monte è unito alla regione promotoriale della copia a valle, è mostrato nel cromatogramma. Il riquadro nell'angolo in alto a destra indica la sequenza di 7 bp di omologia tra l'introne 1 il promotore che potrebbe aver mediato l'evento di duplicazione (Tratto da Simioni et al. (2021) [130]).

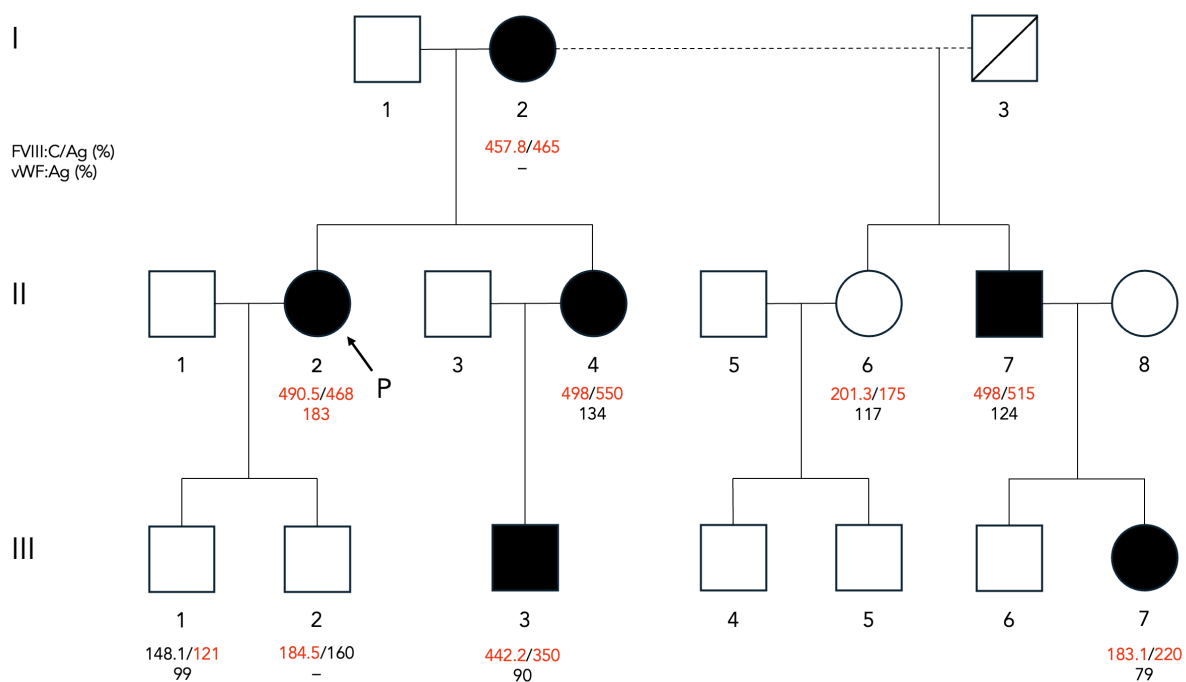


Figura 5.11: Albero genealogico della probanda. Le relazioni di parentela sono rappresentate secondo le linee guida della *National Society of Genetic Counselors (NSGC)*. La probanda è indicata con la lettera «P». Sotto ad ogni individuo affetto sono rappresentati i valori di FVIII attività e antigene nella prima riga (o la media di misurazioni ripetute), e di vWF antigene nella seconda riga. Dove non disponibile, il valore di vWF è sostituito dal simbolo «-».

5.3 Sintesi dei risultati dello studio familiare

Tutte le analisi statistiche sono basate sul *dataset* riportato in Tabella 5.14. La prima osservazione che si vuole riportare è il confronto tra l'età d'esordio del primo evento trombotico nei pazienti trattati. Con soli 4 soggetti con evento noto, la correlazione osservata ($\rho=-0,32$; $p_{asintotico}=0,68$, $p_{esatto}=0,67$) non ha alcun significato interpretabile: l'intervallo di confidenza *bootstrap* copre l'intero range possibile $(-1,00; +1,00)$, come visibile dalla Figura 5.12. Se è vero che il paziente con livelli più bassi di FVIII:C (PI-2) è anche quello con l'esordio più tardivo di TEV, è altrettanto vero che il paziente con esordio più precoce di TEV è proprio la probanda (PII-2), che non presenta però i livelli di FVIII:C più alti tra i membri della famiglia, vanificando un eventuale correlazione tra queste due variabili. Il dato descrittivo più solido resta la distribuzione grezza delle età: 17, 31, 39, 59 anni - un range molto ampio anche all'interno della stessa famiglia, che di per sé suggerisce che il solo genotipo non agisca in modo deterministico sull'età di esordio (coerente con la penetranza incompleta ed età-dipendente già discussa in precedenza). La seconda analisi indaga la possibile correlazione tra età dei pazienti e valori di FVIII attività e antigene. Entrambe le correlazioni (Figura 5.13) mostrano una tendenza positiva debole, seppur non significativa (FVIII:C: $\rho=0,55$, $p=0,13$; FVIII:Ag: $\rho=0,49$, $p=0,18$). L'elemento più informativo è la separazione netta tra portatori e non portatori: i portatori si collocano quasi sempre sopra 400% di FVIII:C indipendentemente dall'età, mentre i non portatori restano sotto 210% a ogni età testata. Questo è coerente con l'interpretazione che il genotipo, più dell'età, sia il principale determinante del livello di FVIII in questa famiglia — l'età aggiunge, se non altro, una modesta variabilità secondaria.

Infine, si è indagata la possibilità che i valori di FVIII siano influenzati dal sesso dei pazienti, in quanto è noto che nella popolazione generale i livelli della proteina sono condizionati dal gruppo sanguigno ABO e in parte dal sesso. Come mostra la Figura 5.14, il confronto tra i 4 portatori di sesso femminile (mediana FVIII:C 470,4%) e i 2 di sesso maschile (mediana 470,1%) non mostra alcuna differenza (Mann-Whitney $p=1,00$): con tali bassi numeri, un risultato di questo tipo è atteso indipendentemente dalla biologia sottostante, e non può essere interpretato come evidenza di assenza di effetto del sesso. Va evidenziata la presenza di un paziente femminile (PIII-7) con valori di FVIII:C $< 200\%$, nonostante la positività alla duplicazione; questo dato potrebbe essere interpretato come la stretta dipendenza dei valori di FVIII:C da quelli di vWF:Ag: rispetto agli altri familiari di sesso femminile, la paziente in questione presenta infatti dei livelli di vWF spostati verso l'estremo inferiore, che potrebbero spiegare quest'anomalia.

Sulla base dello studio familiare descritto, è possibile delineare alcune caratteristiche cliniche e laboratoristiche che possono far sospettare la presenza della duplicazione *F8* Padova. Dal punto di vista clinico, il quadro è caratterizzato da una marcata familiarità per tromboembolismo venoso (TEV), con molteplici eventi, anche non provocati, che tendono a manifestarsi già nella giovane età adulta (<40 anni) e che possono presentare carattere recidivante (Tabella 5.13). Dal punto di vista laboratoristico, l'elemento più caratteristico è rappresentato da livelli marcatamente aumentati di FVIII, sia in termini di attività sia di antigene, generalmente pari a 3–4 volte i valori normali e, in alcuni casi, fino a 5 volte superiori alla norma (sempre $>200\%$). Gli altri fattori della coagulazione risultano invece nei rispettivi intervalli di riferimento. Il pannello trombofilico convenzionale non evidenzia alterazioni e anche i livelli di vWF risultano nella norma, rendendo meno probabile

che l'incremento del FVIII sia secondario a una risposta di fase acuta o correlato a un concomitante aumento del vWF. Tutti i membri della famiglia analizzati risultano inoltre negativi per anticorpi antifosfolipidi. Dal punto di vista genetico, non vengono identificate le principali varianti trombofiliche comunemente ricercate, quali il fattore V Leiden e la variante G20210A della protrombina. Il sequenziamento Sanger convenzionale degli esoni e del promotore di *F8* non consente di identificare l'alterazione. In presenza di un quadro clinico e laboratoristico di questo tipo, l'analisi mediante MLPA rappresenta pertanto un approccio utile per evidenziare variazioni del numero di copie (*copy number variations, CNV*) a carico di *F8*, inclusa la duplicazione dell'esone 1.

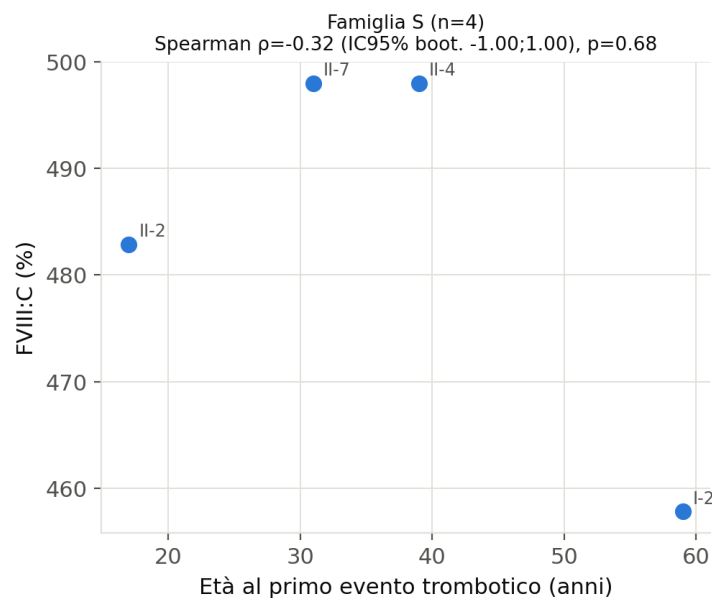


Figura 5.12: In ordinata valori di FVIII attività (FVIII:C); in ascissa età al primo evento; soli soggetti con evento noto della famiglia S (n=4).

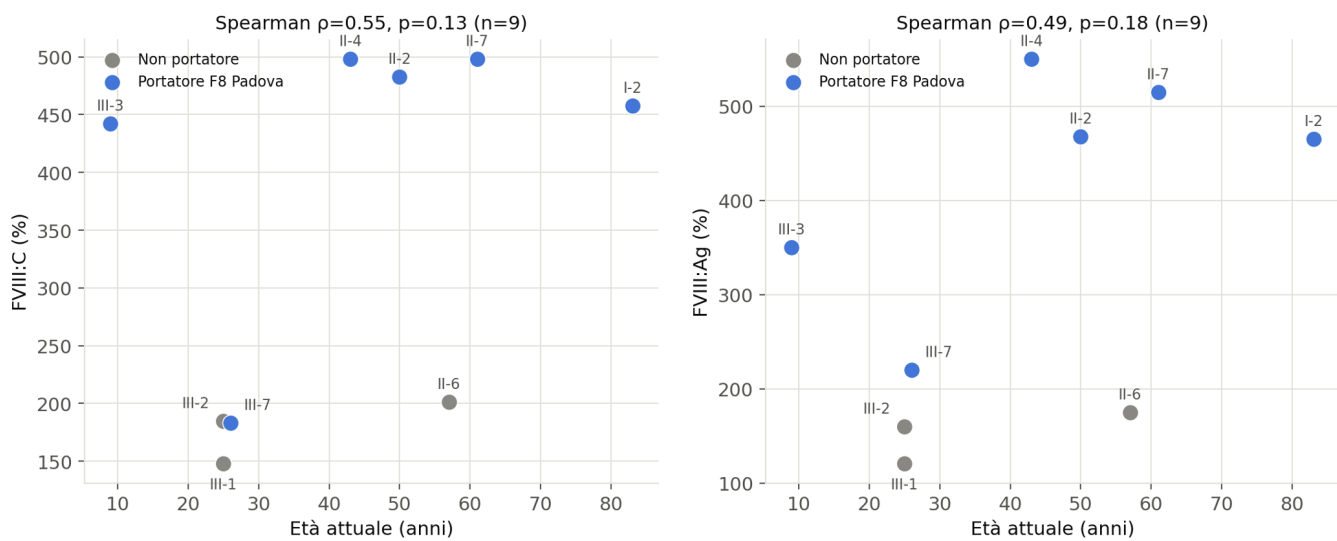


Figura 5.13: Età attuale vs FVIII:C (sinistra) e FVIII:Ag (destra), tutti i 9 soggetti della famiglia S; blu = portatori, grigio = non portatori.

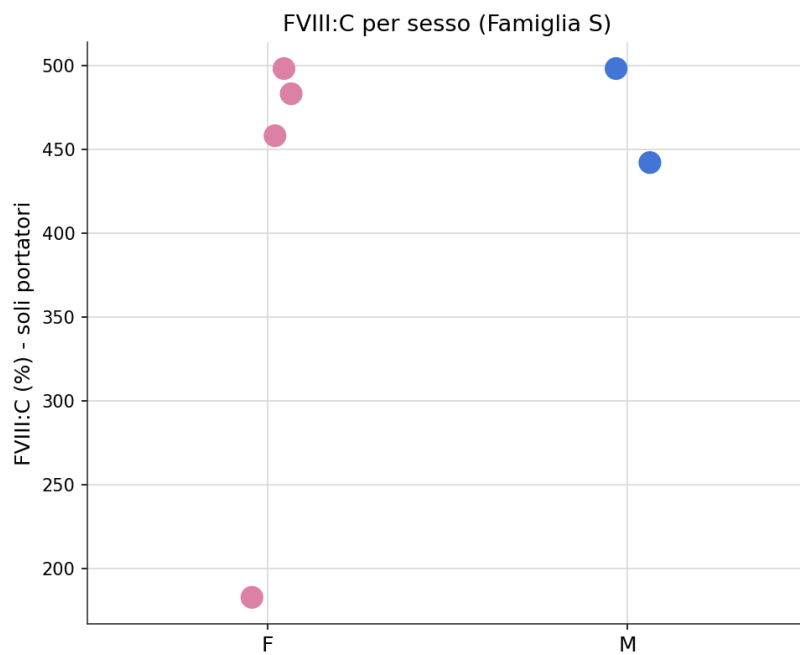


Figura 5.14: Confronto tra i valori di FVIII:C e il sesso dei membri della famiglia S.

Tabella 5.13: Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei soggetti analizzati

ID	Sesso	Età (anni)	Eventi trombotici	Età 1° evento (anni)	Fattori scatenanti	FVIII:C (%)	FVIII:Ag (%)	Dup F8	Terapia anticoagulante attuale
I-2	F	83	TVP, EP	59	Nessuno	457.8	465	Presente	Rivaroxaban 10mg
II-2	F	49	TVP	17	OCP	482.9	–	Presente	Edoxaban 30mg
II-4	F	43	TVP	39	Sars-Cov-2	498.0	550	Presente	Nessuna
II-6	F	57	Nessuno	–	–	201.3	175	Assente	Nessuna
II-7	M	61	TVP	31	Nessuno	498.0	515	Presente	Rivaroxaban 10mg
III-1	M	25	Nessuno	–	–	148.1	121	Assente	Nessuna
III-2	M	25	Nessuno	–	–	184.5	160	Assente	Nessuna
III-3	M	9	Nessuno	–	–	442.2	350	Presente	Nessuna
III-7	F	26	Nessuno	–	–	183.1	220	Presente	Nessuna

5.4 Risultati della ricerca bibliografica

5.4.1 Livelli elevati di FVIII come fattore di rischio indipendente per il TEV

L'evidenza epidemiologica di un ruolo causale del FVIII geneticamente determinato è stata fornita dal *Leiden Thrombophilia Study*, che ha dimostrato una relazione dose-dipendente tra i livelli di FVIII:C e il rischio di primo episodio di TVP: i soggetti con FVIII:C $\geq 150\%$ (circa l'11% della popolazione sana) presentavano un rischio circa 5 volte superiore rispetto agli individui con valori inferiori al 100%, e tale associazione persisteva dopo correzione per i livelli di vWF, indicando un effetto del FVIII indipendente dalla sua proteina *carrier* [138]. Questo dato è stato confermato da uno studio caso-controllo indipendente, che ha identificato un'elevata concentrazione plasmatica di FVIII:C come fattore di rischio maggiore e indipendente per un primo episodio di TEV [139]. Il significato prognostico dell'elevazione del FVIII non si limita al primo evento: in una coorte prospettica di pazienti con un primo episodio di TEV spontaneo, livelli persistentemente elevati di FVIII, misurati dopo la sospensione della terapia anticoagulante, si sono associati a un rischio marcatamente aumentato di recidiva, indipendentemente dagli altri difetti trombofilici identificati [140]. Nel complesso, questi studi hanno stabilito che l'elevazione del FVIII rappresenta un fattore predittivo prevalente, dose-dipendente e indipendente sia per gli eventi incidenti sia per le recidive di TEV [141]. Studi sperimentali hanno ulteriormente rafforzato l'ipotesi di un ruolo causale, e non puramente associativo, del FVIII nella trombogenesi patologica. In modelli murini, l'elevazione acuta del FVIII plasmatico ha aumentato la trombogenicità arteriolare con andamento non lineare, con un

effetto che raggiunge un *plateau* a livelli superiori a quelli fisiologici [142]. In un modello di trombosi venosa nel coniglio, l'infusione endovenosa di FVIII ricombinante umano ha potenziato la formazione e la propagazione del trombo attraverso un meccanismo che coinvolge il fattore XI e il reclutamento del FVIII mediato dal vWF, a supporto di un contributo diretto dell'elevazione del FVIII alla crescita del trombo, e non di un semplice ruolo di *bystander* [143].

Nonostante questa solida evidenza epidemiologica e meccanicistica, i determinanti genetici specifici responsabili di livelli marcatamente elevati di FVIII in singole famiglie trombofiliche sono rimasti in gran parte sconosciuti fino a tempi recenti. Due scoperte indipendenti — un riarrangiamento strutturale del gene *F8* (*F8 Padua*) e una sua mutazione missenso (*F8 Aurora*) — hanno fornito la prima dimostrazione genetica diretta che alterazioni *gain-of-function* sia primarie a carico del gene *F8* stesso, sia a carico dei suoi regolatori trascrizionali, possono determinare un fenotipo trombofilico severo. Queste due varianti, descritte nei seguenti paragrafi, illustrano due meccanismi distinti attraverso cui lo stesso gene, classicamente associato a una patologia emorragica (emofilia A), può invece causare una malattia trombotica: l'aumento dell'espressione genica da una parte e l'alterazione della funzione proteica dall'altra [130, 144].

5.4.2 Fattore VIII Padova

Genotipo

Il FVIII Padova è stato descritto per la prima volta da Simioni et al. [130] in due famiglie italiane non correlate affette da trombofilia severa e livelli plasmatici persistentemente elevati di FVIII in assenza di altri difetti espli-

cativi, e rappresenta la prima variante genetica trombofilica documentata e riscontrata clinicamente. Le indagini genetiche sulla prima famiglia (denominata «famiglia A») hanno combinato l'analisi di *linkage* del gene *F8* con marcatori microsatellite intragenici, *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), *droplet digital PCR* (ddPCR) e *whole-genome sequencing* (WGS), identificando una duplicazione in *tandem* di 23.420 bp della porzione prossimale del gene *F8* (ChX: 154.229.849 – 154.253.268), comprendente il promotore, l'esone 1 e la quasi totalità dell'introne 1. Le due copie sono disposte in tandem, con il medesimo orientamento, senza l'interposizione di sequenze spaziatrici. Entrambi i *breakpoint* ricadono all'interno di elementi ripetuti (Figura 5.15), e la sequenza di giunzione condivide un tratto di omologia di 7 nucleotidi, compatibile con un meccanismo di duplicazione *microhomology-mediated* piuttosto che con un *crossing-over* ineguale. Trattandosi di una variante dominante che agisce sul dosaggio genico, il pattern di trasmissione osservato in entrambe le famiglie è compatibile con un'eredità X-linked con fenotipo dominante. La medesima duplicazione, sullo stesso aplotipo di circa 3 Mb, è stata identificata in una seconda famiglia apparentemente non correlata (denominata «famiglia B»), proveniente dalla stessa area geografica (Italia nordorientale), nell'ambito di uno screening mediante MLPA condotto su 50 pazienti con TEV non correlati e concentrazioni plasmatiche di FVIII $\geq 250\%$. L'analisi aplotipica ha indicato un antenato comune risalente a circa 13 generazioni (≈ 350 anni) fa, coerentemente con un effetto fondatore (*founder effect*). La duplicazione risultava assente in 103 controlli non correlati (154 alleli) provenienti dalla stessa area geografica e nel database *1000 Genomes*, escludendo l'ipotesi di un semplice polimorfismo benigno del numero di copie [130].

Le analisi *in silico* e i saggi *reporter* con luciferasi condotti in cellule endote-

liali (HUVEC) ed epatiche (HepG2) hanno evidenziato che, da un punto di vista meccanicistico, la duplicazione è responsabile di una maggiore attività trascrizionale *enhancer* capace di incrementare l'espressione del *reporter* di oltre 45 volte (Figure 5.16 e 5.17). La duplicazione è pertanto interpretabile come un riarrangiamento *cis*-attivo *gain-of-function* della regione regolatoria all'estremità 5' di *F8*, incrementando la trascrizione piuttosto che alterando la struttura amminoacidica di FVIII [130, 145].

Fenotipo

Il caso indice (appartenente alla famiglia A) è una donna che sviluppò TVP ed EP dopo taglio cesareo all'età di 31 anni, seguite da ulteriori episodi di TVP non provocata a 44 e 46 anni, e da una recidiva potenzialmente fatale con EP all'età di 52 anni, nonostante in cura con warfarin in range terapeutico. Lo *screening* trombofilico è stato negativo, ad eccezione di livelli di FVIII estremamente e persistentemente elevati (FVIII attività fino a $\geq 500\%$, FVIII antigene 432%) in presenza di valori plasmatici normali di vWF (165%). Tra i familiari affetti figurano una zia materna con TVP, EP e TVS, una cugina con TVP e TVS, e un figlio asintomatico portatore dello stesso fenotipo di FVIII elevato, tutti con livelli di vWF nella norma [130].

Nella seconda famiglia (famiglia B), il probando presentò TVP ed EP non provocate a 21 anni d'età e un'ulteriore EP non provocata a 31 anni; si è rivelato portatore della duplicazione di *F8* insieme al fattore V Leiden in eterozigosi, con FVIII attività pari a 264%. La madre (FVIII attività di 508%) soffrì di TVP *post-partum*, mentre la figlia (FVIII attività di 295%) rimase asintomatica al momento della pubblicazione. Complessivamente, 5 portatori su 7 hanno sviluppato TEV (recidivante) in giovane età, e gli autori hanno rilevato come la penetranza sembrasse essere modulata dalla coeredità

di altri fattori protrombotici (come nella famiglia B), oltre che dall'età, da condizioni acquisite e dall'inattivazione X sbilanciata nelle donne eterozigoti [130].

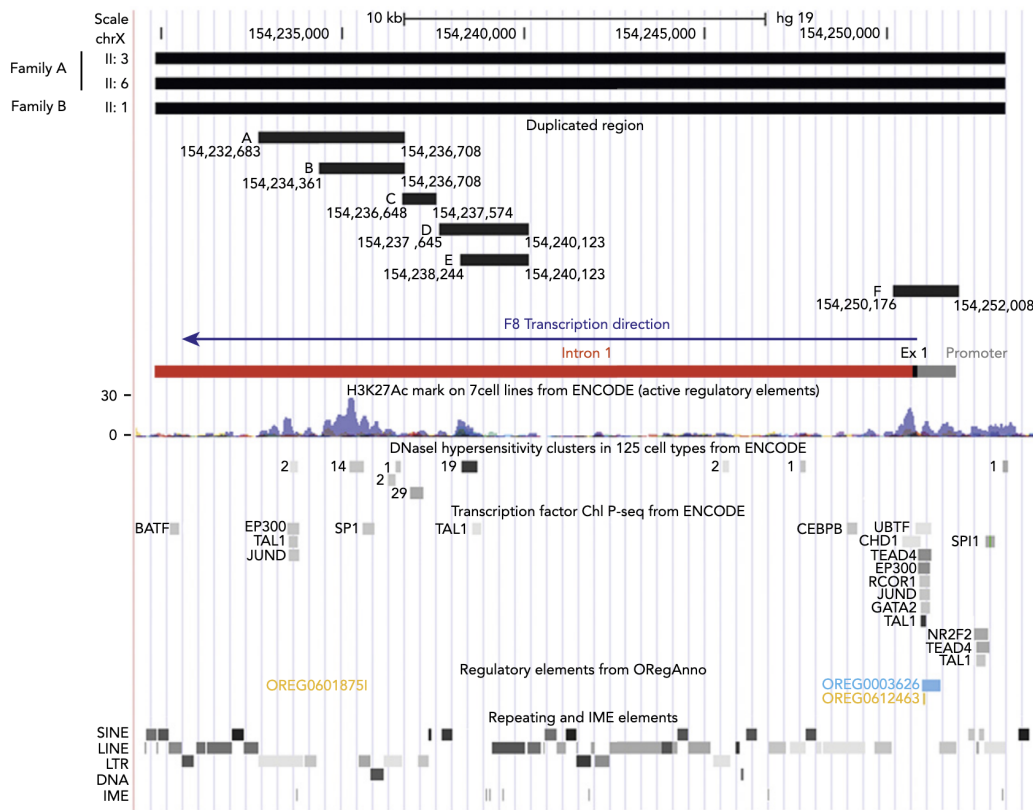


Figura 5.15: Identificazione degli elementi regolatori nella regione duplicata, mostrata in altro: sono indicate le regioni enhancer A, B, C, D, E, F. In basso sono mostrate le localizzazioni dei picchi di H3K27Ac, dei siti di ipersensibilità alla DNasi I e di legame degli specifici fattori di trasacrizione (da ENCODE), così come gli elementi ripetitivi e regolatori (da ORegAnno) e dei motivi IME (da FIMO) [130].

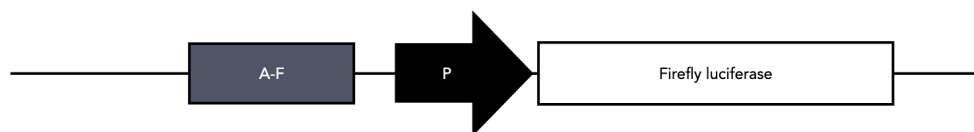


Figura 5.16: Vettore di clonaggio che contiene le regioni A-F inserite a monte di un promotore minimo (es: TATA-box già presente nel vettore vuoto), regolanti l'espressione della luciferasi Firefly. Il vettore è stato trasfettato in cellule HUVECs e HepG2 insieme ad un vettore esprimente la luciferasi Renilla [130].

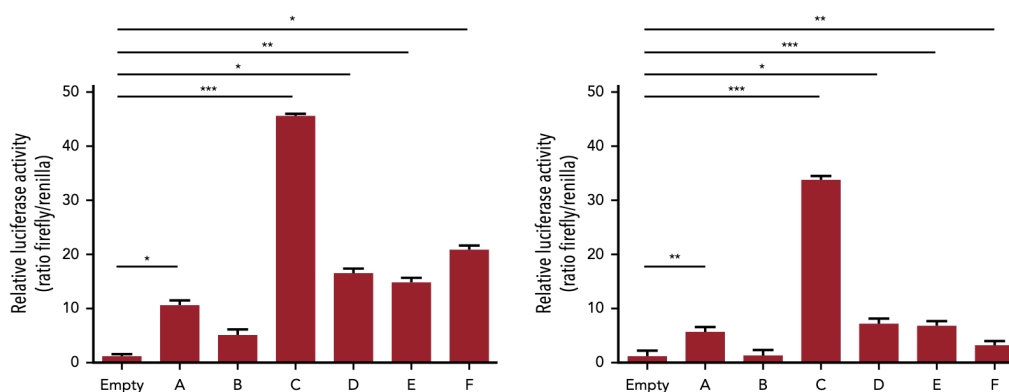


Figura 5.17: Dopo 12 ore, le cellule HUVECs (a sinistra) e HepG2 (a destra) sono state lisate, valutando l'attività delle luciferasi. I dati sono stati normalizzati per i vettori vuoti contenuti solo il promotore minimo, e per la fluorescenza di Renilla. Le barre verticali rappresentano media e deviazione standard di 6 (HUVECs) e 4 (HepG2) replicati [130].

5.4.3 Fattore VIII Aurora

Genotipo

Il FVIII Aurora è stato descritto da Wischmeyer et al. [144] in una breve comunicazione riguardante un singolo paziente maschio di 18 anni con TEV ricorrente fin dalla nascita e un pannello trombofilico convenzionale negativo, identificato nell'ambito di uno studio di coorte prospettico dell'Università del Colorado Anschutz su pazienti con trombosi e ictus. Il *whole-genome sequencing* ha identificato una singola variante missenso A590S non precedentemente descritta a carico del gene *F8* (RefSeq NM_000132.4: c.1770G>T,

esone 12 del *F8*, ChrX), nel dominio A₂ del FVIII (secondo la nomenclatura HGVS, comprensiva del peptide segnale); nessun'altra proteina della coagulazione presentava mutazioni rilevanti [144].

A differenza del *F8* Padova, che agisce sull'espressione genica, il *F8* Aurora è una mutazione puntiforme che altera la proteina matura. Il residuo mutato si colloca all'interfaccia del *loop* 558–565 del dominio A2, un noto sito di interazione con il dominio proteasico del FIXa attivato, e si trova a una distanza superiore a 10 Å dal sito di *clivaggio* dell'APC (Arg562): questo dato strutturale, prodotto dallo studio di Morris et al. [146], depone contro un effetto sterico diretto della mutazione sul legame dell'APC, diversamente da quanto originariamente ipotizzato sulla base della sola modellizzazione predittiva [144]. Analogamente, l'analisi cinetica diretta non ha evidenziato alcuna differenza nei parametri di Michaelis-Menten (K_m e k_{cat}) per l'attivazione del FX tra FVIIIa-R571S e FVIII-WT, confutando sperimentalmente l'ipotesi iniziale, basata su analisi di *docking* in silico, di un'alterata affinità per il complesso Xase con FX/FXa [146].

Il meccanismo molecolare effettivo, definito mediante saggi di Xase intrinseco con proteina ricombinante, risiede invece in un marcato incremento dell'affinità di legame per il FIXa attivato: FVIIIa-R571S mostra una costante di dissociazione apparente (K_d) per il FIXa di $0,1 \pm 0,02$ nM, rispetto a $1,8 \pm 0,5$ nM per FVIIIa-WT, corrispondente a un aumento di affinità di 10–20 volte, in assenza di differenze nell'efficienza catalitica del complesso Xase una volta assemblato [146].

Fenotipo

L'iter diagnostico di laboratorio del probando ha evidenziato una netta dissociazione tra i saggi: l'attività coagulativa del FVIII con metodica *one-stage*

è risultata marcatamente elevata (tra il 300% e il 900% rispetto al plasma di controllo), mentre l'antigene del FVIII e l'attività cromogenica sono risultate normali; l'aPTT si collocava al limite inferiore dell'intervallo di norma (25 secondi) e il D-dimero era elevato [144]. Questo pattern, dato da normali livelli antigenici a fronte di un'attività *clot-based* sproporzionatamente elevata, indica un guadagno funzionale qualitativo e non un incremento della quantità di proteina circolante, distinguendo meccanicisticamente il *F8 Aurora* dal *F8 Padova*. Lo stesso paziente descritto nel lavoro originale è in seguito deceduto precocemente, a ulteriore testimonianza della severità clinica del fenotipo [146].

La caratterizzazione funzionale mediante *calibrated automated thrombogram* (CAT) ha evidenziato una spiccata resistenza alla *downregulation* FVIIIa-mediata dall'APC; tale resistenza è stata confermata anche da un saggio dedicato (metodica Chromogenix modificata sostituendo plasma carente di FVIII a quello carente di FV), che ha mostrato un rapporto dei tempi di coagulazione con/senza APC pari a 2,74 nel paziente contro un valore di controllo di 4,05 [144]. L'analisi di 441 campioni plasmatici con FVIIIc (attività) compreso tra il 57% e il 700% del normale, privi di altri tratti trombofilici, non ha mostrato alcuna correlazione tra il livello di FVIIIc e il grado di resistenza osservato al CAT-TM ($R^2 = 0,01$), a dimostrazione che la ridotta responsività all'APC osservata nel paziente non è un semplice epifenomeno dell'elevata attività del FVIII, bensì una caratteristica specifica della variante *Aurora* [144].

Il meccanismo molecolare del *F8 Aurora* è stato chiarito successivamente da Morris et al. [146], come descritto sopra. In assenza di FIXa, FVIIIa-R571S mostra una dissociazione spontanea del dominio A2 e una suscettibilità al *clivaggio* proteolitico dell'APC (ai siti Arg336 e Arg562) del tutto sovrapp-

ponibili al FVIII-WT: la variante non è pertanto intrinsecamente resistente all'APC. La resistenza funzionale osservata nel paziente risulta invece FIXa-dipendente: in presenza di concentrazioni sub-saturanti di FIXa (che modellano condizioni fisiologiche), l'aumentata affinità di FVIIIa-R571S per il FIXa ne potenzia la protezione dalla dissociazione del dominio A2 e dal *clivaggio* APC-mediato al residuo Arg562, un meccanismo protettivo già noto per l'interazione FVIIIa-FIXa ma qui amplificato dalla maggiore affinità della variante. Questi risultati sono poi stati confermati anche *in vivo* in topi emofilici, sempre da Morris et al. [146].

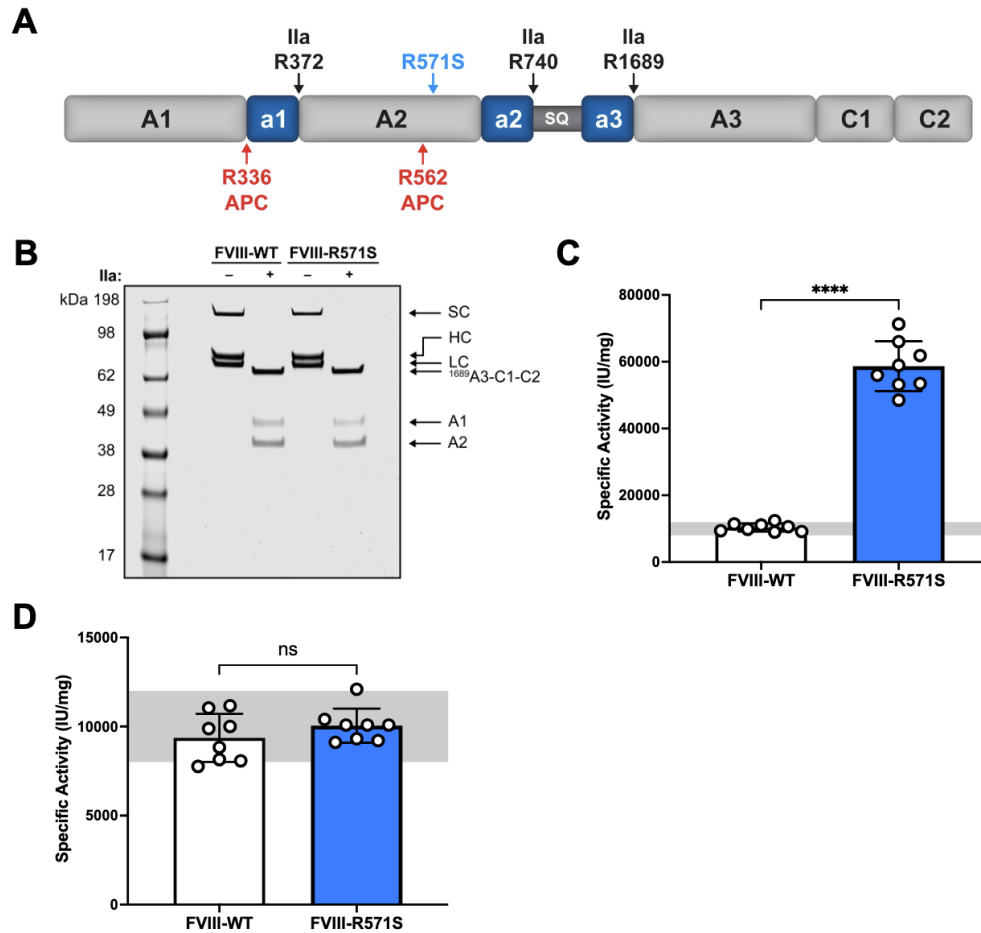


Figura 5.18: Attività specifica del FVIII-R571S ricombinante. (A) Struttura a domini del FVIII, con indicazione della localizzazione della mutazione Arg571Ser (in blu), dei siti di clivaggio della proteina C attivata (APC, in rosso) e dei siti di clivaggio trombinico (in nero). (B) Elettroforesi su gel SDS-PAGE di 2 μ g di FVIII-WT e FVIII-R571S ricombinanti, prima e dopo l'attivazione trombinica. (C) Attività specifica di FVIII-WT e FVIII-R571S determinata mediante saggio coagulativo one-stage e (D) mediante saggio cromogenico, su un intervallo di concentrazioni di FVIII compreso tra 1 e 0,01 nM. L'area ombreggiata in grigio rappresenta il range di normalità dell'attività specifica del FVIII (8000–12000 U/mg). La significatività statistica è stata determinata mediante t-test non appaiato a due code. SC, catena singola; HC, catena pesante; LC, catena leggera; ns, non significativo; ****P < 0,0001 [146].

5.4.4 Confronto delle famiglie con mutazioni protrombotiche del FVIII

Confrontare famiglie diverse con la stessa alterazione (o alterazioni imparentate, come nella Famiglia B con fattore V Leiden concomitante) è funzionale, con dati limitati, a valutare se l'età di esordio sia un tratto relativamente stabile della duplicazione *F8* Padova. Prendendo in esame, oltre alla famiglia S, anche le famiglie A e B descritte da Simioni et al. (2021) [130] e il paziente Aurora [144], osserviamo nella Figura 5.19 che le mediane di età al primo evento trombotico sono 35 anni nella famiglia S ($n=4$), 43 anni nella famiglia A ($n=3$) e 22,5 anni nella famiglia B ($n=2$, portatori anche di fattore V Leiden). Il test di Kruskal-Wallis limitato alle tre coorti *F8* Padova non mostra differenze significative ($p=0,27$) - con questi numeri. Anche provando a ricalcolare la correlazione tra età d'esordio e FVIII:C considerando questa volta tutti gli individui portatori di *F8* Padova (Famiglia S + A + B, Figura 5.20), l'intervallo di confidenza risulta ancora non accettabile e la stima non interpretabile come una relazione dose-effetto. È possibile fare solo un'osservazione: gli unici due pazienti della famiglia B con clinica positiva hanno manifestato i primi eventi sempre entro i 30 anni di vita, a differenza dei membri delle altre famiglie (S e A) che hanno sviluppato eventi dopo quest'età, fatta eccezione per la probanda della famiglia S (PII-2), che presentò il primo evento a 17 anni ma sotto terapia anticoncezionale, e quindi con un possibile fattore di rischio concomitante. Questo dato è coerente con la deduzione che la concomitanza di due mutazioni trombofiliche (*F8* Padova e FV Leiden) conduca ad un fenotipo più severo rispetto alla presenza di una sola. Il dato qualitativamente più rilevante resta il paziente Aurora: esordio con trombosi fin dalla nascita, il fenotipo più precoce e severo dell'intero

confronto, e l'unico caso, tra tutti quelli disponibili, con esito fatale documentato. Questo è coerente con la revisione della letteratura già riporta — gli autori di Morris et al. (2026) [146] descrivono il fenotipo associato al fattore VIII Aurora come più severo di quello associato al fattore IX Padova [96] — e con un'importante distinzione meccanicistica: un guadagno di funzione qualitativo come quello caratterizzante il FVIII Aurora sembra produrre un fenotipo clinico più severo di un esclusivo aumento quantitativo del FVIII (Padova). In altre parole, un cambiamento della struttura terziaria associato ad un incremento funzionale dell'attività catalitica del FVIII risulta più efficace nella trombogenesi rispetto all'aumento di concentrazione del FVIII stesso in assenza di modifiche strutturali.

Il risultato più informativo di questa indagine è rappresentato dalla curva costruita secondo il modello di sopravvivenza Kaplan-Meier (Figura 5.21): nella coorte combinata ($n=13$, famiglie S, A e B), la proporzione libera da eventi scende sotto il 60% già entro i 31 anni e si azzerà per il soggetto più anziano (59 anni), mentre i 4 non portatori osservati (età 25-57 anni) non hanno ancora presentato alcun evento. Vanno però ricordati con la massima chiarezza i due limiti già discussi: si tratta di soli 13 soggetti, in parte imparentati tra loro (non indipendenti), provenienti da famiglie giunte all'osservazione clinica proprio a causa della trombofilia - questa curva descrive quindi il decorso osservato in famiglie clinicamente selezionate, non la vera penetranza cumulativa nella popolazione generale dei portatori della duplicazione, che è verosimilmente più bassa. Inoltre, i soggetti non entrano nello studio alla nascita, ma all'età in cui sono stati arruolati/testati (che va dai 9 ai 61 anni per i portatori, secondo la Tabella 5.13) — il che introduce il fenomeno noto come *left truncation* (ingresso ritardato): un soggetto che avesse avuto un evento molto precoce e grave prima dell'età di arruolamento

non potrebbe comparire nel campione, e la stima *naïve* della sopravvivenza alle età più giovani ne risulta potenzialmente distorta. Per il TEV, evento raramente immediatamente fatale, l'impatto pratico di questo effetto è probabilmente modesto.

L'ultima analisi proposta è la sospetta correlazione tra valori di FVIII:C e severità del quadro clinico (Figura 5.22). La severità delle manifestazioni cliniche è stata arbitrariamente definita come uno score da 0 a 4, dove viene attribuito 1 punto per ciascuno dei seguenti criteri: 1) lo sviluppo di eventi trombotici spontanei; 2) la presenza di recidive (≥ 2 eventi); 3) lo sviluppo di embolia polmonare oltre al solo TEV; 4) necessità di interventi invasivi o sequele croniche documentate (stent, endoflebectomia, sindrome post-trombotica). Dai dati ottenuti non emerge alcuna correlazione ($\rho=-0,18$; $p=0,63$). Il dato qualitativamente più interessante è non statistico: II-4, uno dei soggetti con FVIII:C più alto dell'intera famiglia (498%), ha il punteggio di severità più basso (0 — singolo evento provocato, nessuna recidiva, nessun intervento), nonostante valori molto elevati di FVIII attività. Va esplicitato, tuttavia, che questo dato deriva dalla costruzione specifica dello score: la paziente II-4 ha sì sviluppato un evento trombotico, ma in presenza di un possibile fattore scatenante (Covid-19), evento che potrebbe quindi non essersi verificato in assenza del cofattore. Fatta questa precisazione, i risultati sono coerenti con quanto già discusso a proposito della penetranza modulata da fattori acquisiti e dall'inattivazione del cromosoma X: il livello di FVIII misurato non è, da solo, un buon indicatore della severità clinica attesa in un singolo individuo.

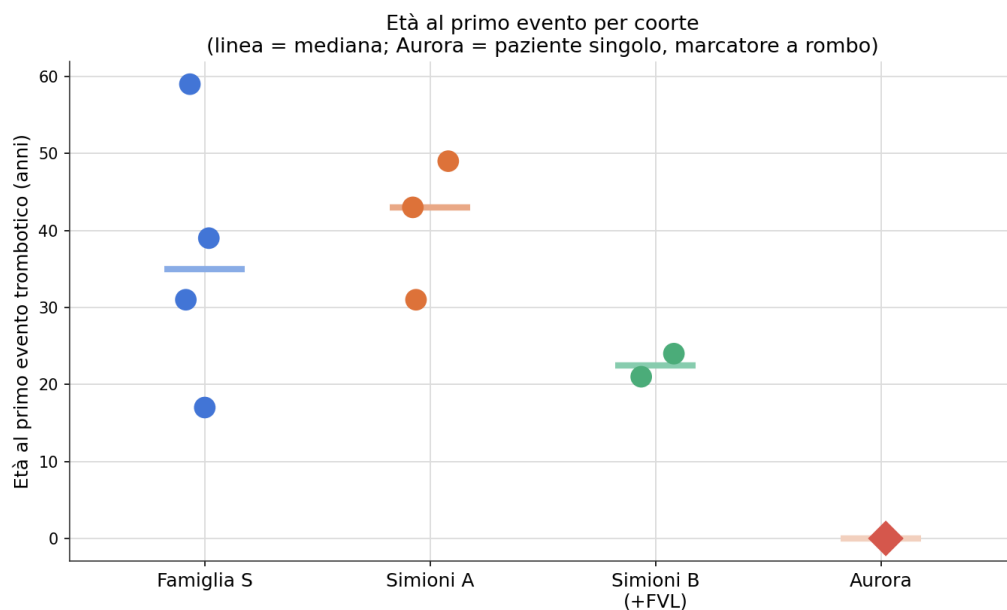


Figura 5.19: Età al primo evento per coorte (linea = mediana; il paziente Aurora, $n=1$, è mostrato come riferimento qualitativo, non come braccio del test statistico).

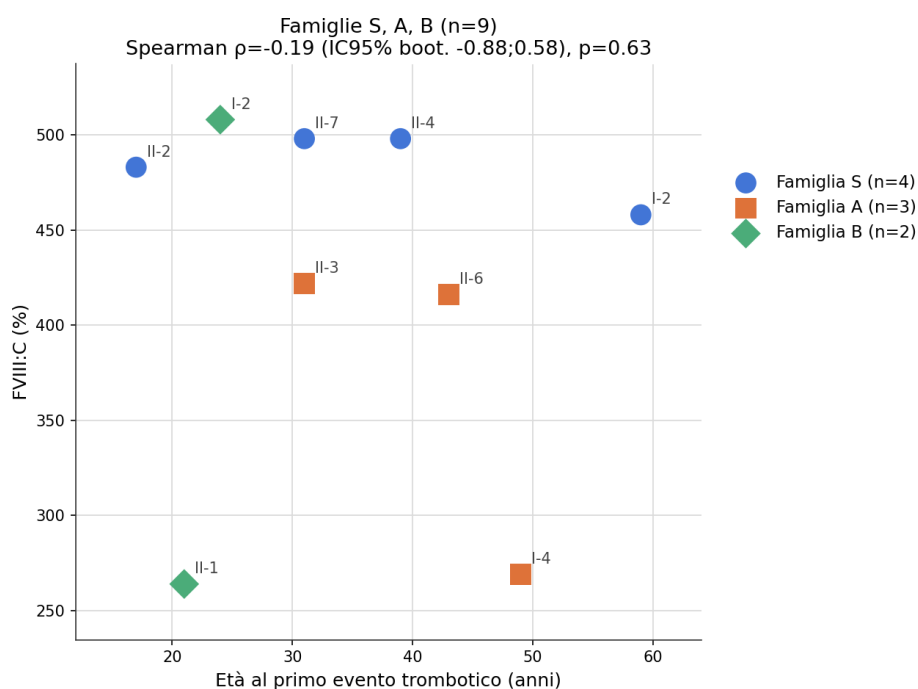


Figura 5.20: In ordinata valori di FVIII attività (FVIII:C); in ascissa età al primo evento; soli soggetti con evento noto di tutti i pazienti con *F8* Padova.

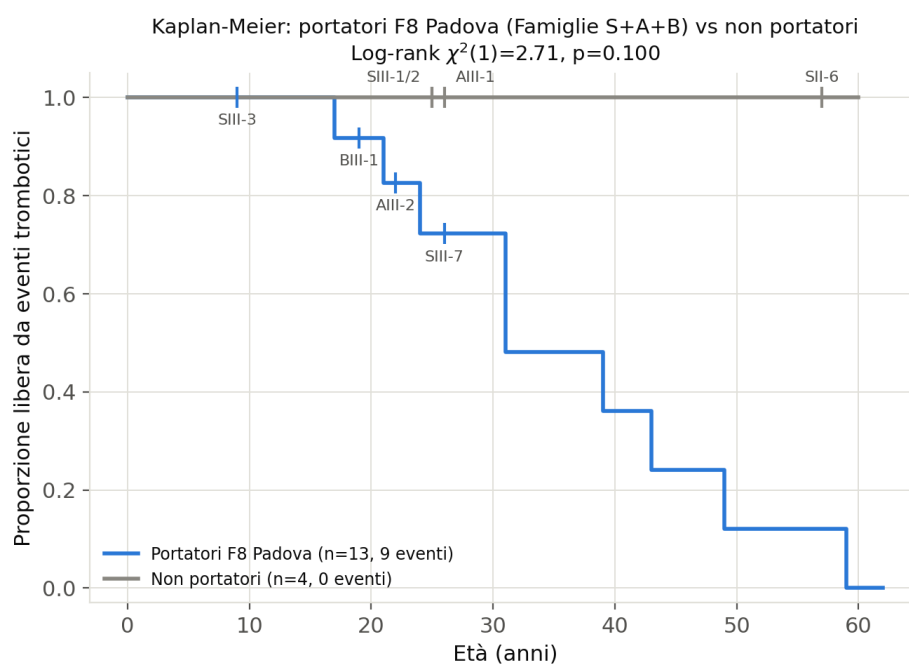


Figura 5.21: Proporzion libera da eventi trombotici per età, portatori *F8* Padova (Famiglia S + A + B; escluso il paziente Aurora) vs non portatori (n=4). I trattini verticali rappresentano i pazienti censurati alle rispettive età attuali, con il codice identificativo dell'albero genealogico preceduto dalla lettera della rispettiva famiglia.

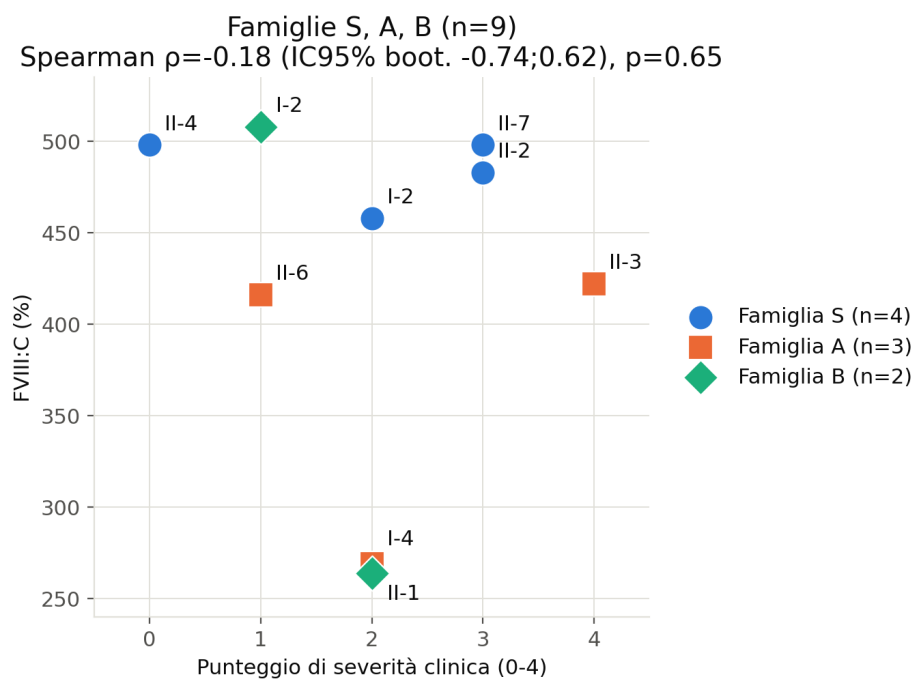
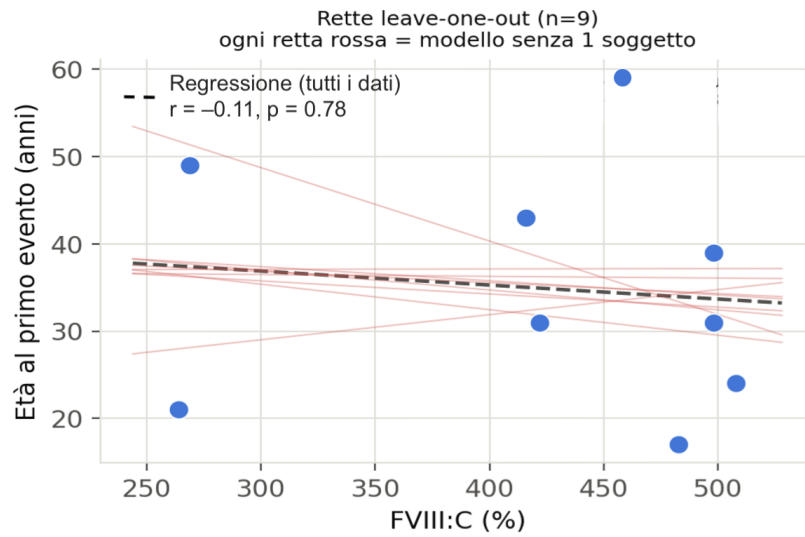


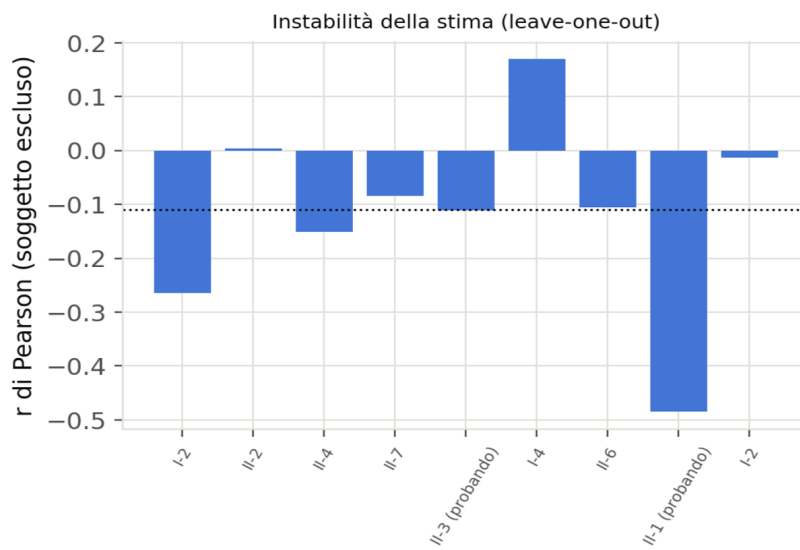
Figura 5.22: FVIII:C vs punteggio di severità (0-4), soggetti con evento noto (n=9).

5.4.5 Modello predittivo dell'età di esordio

Lo scopo delle ricerche genetiche e statistiche effettuate sui pazienti con patologie dai meccanismi e dalla clinica parzialmente o talmente ignota è quello di fornire cure migliori per il paziente. Per la condizione protrombotica affrontata, sarebbe utile la possibilità di predire dati essenziali come l'età di esordio delle prime manifestazioni cliniche e la severità di queste; capacità che permetterebbe di stratificare il rischio dei pazienti affetti e di migliorarne la gestione terapeutica. Con tale obiettivo, si è tentato lo sviluppo di un modello predittivo sui 9 soggetti con evento noto e FVIII:C disponibile (Famiglia S + famiglia A + famiglia B), modello che si è rivelato stimare una relazione debole e non significativa ($r=-0,11$; $p=0,78$), come evidente dalla Figura 5.23. Il dato realmente istruttivo è però nel riquadro a destra: escludendo un solo soggetto alla volta, il coefficiente varia da $-0,48$ a $+0,17$ — cambia cioè di segno. Questa è la dimostrazione empirica, non solo l'affermazione teorica, che un *algoritmo* costruito su questi numeri non descriverebbe una relazione biologica stabile, ma soprattutto quale singolo individuo è incluso nel campione. Non essendo quindi possibile costruire un modello predittivo formale su questi dati, ci si limita a mostrarne esplicitamente l'instabilità come risultato metodologicamente onesto.



(a)



(b)

Figura 5.23: (a): rette di regressione *leave-one-out* (una per ciascun soggetto escluso). (b): coefficiente di correlazione ricalcolato escludendo, di volta in volta, un solo soggetto (n=9, aggrega tesi + Simioni A + Simioni B).

Tabella 5.14: Dataset delle analisi statistiche, che riassume i parametri di tutti gli individui delle famiglie indagate.

Coorte	ID	Variante	Sesso	Età	Genotipo	FVIII:C	FVIII:Ag	vWF:Ag	Età 1° evento	Tipo eventi	N. ev. spontanei	Sev.
Famiglia S	I-2	F8 Padova	F	83	Presente	457.8	465	–	59	TVP, EP	2	2
Famiglia S	II-2	F8 Padova	F	50	Presente	482.9	468	183	17	TVP	2	3
Famiglia S	II-4	F8 Padova	F	43	Presente	498.0	550	134	39	TVP a.s. in SARS-CoV-2	0	0
Famiglia S	II-6	F8 Padova	F	57	Assente	201.3	175	117	–	–	0	0
Famiglia S	II-7	F8 Padova	M	61	Presente	498.0	515	124	31	TVP, EP	2	3
Famiglia S	III-1	F8 Padova	M	25	Assente	148.1	121	99	–	–	0	0
Famiglia S	III-2	F8 Padova	M	25	Assente	184.5	160	–	–	–	0	0
Famiglia S	III-3	F8 Padova	M	9	Presente	442.2	350	90	–	–	0	0
Famiglia S	III-7	F8 Padova	F	26	Presente	183.1	220	79	–	–	0	0
Famiglia A	II-3	F8 Padova	F	53	Presente	422.0	432	165	31	TVP, EP	6	4
Famiglia A	I-4	F8 Padova	F	77	Presente	269.0	296	144	49	TVP, EP	1	2
Famiglia A	II-6	F8 Padova	M	45	Presente	416.0	372	60	43	TVS, TVP	2	1
Famiglia A	III-1	F8 Padova	M	26	Assente	132.0	152	144	–	–	0	0
Famiglia A	III-2	F8 Padova	M	22	Presente	323.0	368	112	–	–	0	0
Famiglia B	II-1	F8 Padova + FVL	M	41	Presente + FVL het	264.0	273	78	21	TVP, EP	2	2
Famiglia B	I-2	F8 Padova + FVL	F	66	Presente + FVL het	508.0	457	68	24	TVP	1	1
Famiglia B	III-1	F8 Padova + FVL	F	19	Presente + FVL het	295.0	270	113	–	–	0	0
Aurora	Probando	F8 Aurora	M	18	Presente	>300	<i>normale</i>	–	0	TVP rec. da nascita	–	–

Discussione

Il presente lavoro ha caratterizzato, su 3 generazioni e 9 soggetti, una nuova famiglia portatrice della duplicazione *F8* Padova, integrando dati genetici, biochimici, funzionali e clinici e confrontandoli con quanto già pubblicato per questa stessa alterazione e per la variante missenso *F8* Aurora.

6.1 Sintesi del lavoro svolto

La probanda (II-2), giunta all'osservazione per trombosi venosa profonda ricorrente e idiopatica in presenza di un pannello trombofilico di primo livello nella norma, è risultata portatrice di una duplicazione parziale del gene *F8* di 23.420 bp — la medesima alterazione genomica descritta per la prima volta da Simioni et al. nel 2021 [130] e denominata «*F8* Padova». L'analisi di segregazione familiare, condotta mediante MLPA e confermata da una PCR con primer specifici per la giunzione di duplicazione, ha identificato la stessa alterazione in altri 6 familiari su 3 generazioni (I-2, II-4, II-7, III-3, III-7, oltre alla probanda II-2), con un pattern di trasmissione coerente con un'eredità X-linked a fenotipo dominante — sia i portatori emizigoti maschi (II-7, III-3) sia le portatrici eterozigoti femmine presentano infatti livelli marcatamente elevati di FVIII. Il fenotipo biochimico si è confermato notevolmente omoge-

neo: attività di FVIII compresa fra il 183% e il 498% (soggetti con Dup F8 presente), a fronte di un pannello trombofilico convenzionale (fattore V Leiden, protrombina G20210A, anticorpi antifosfolipidi, resistenza alla proteina C attivata, deficit di antitrombina/proteina C/proteina S) sistematicamente nella norma e di livelli di vWF non proporzionalmente aumentati — un pattern di laboratorio definito suggestivo di questa specifica alterazione. Sul piano clinico, 4 dei 6 portatori con dati disponibili (I-2, II-2, II-4, II-7) hanno un episodio documentato di TEV, con età di esordio compresa fra 17 e 59 anni, mentre nessuno dei tre non-portatori (II-6, III-1, III-2) ha una storia trombotica.

L'approfondimento funzionale (tromboelastometria rotazionale e aggregometria piastrinica) ha fornito, a livello individuale, ulteriori elementi descrittivi compatibili con uno stato tendenzialmente ipercoagulabile nei portatori, sebbene questi parametri non si prestino, con soli 6-9 soggetti, a un confronto statistico di gruppo dotato di reale potenza.

6.2 Il contributo genetico: una terza famiglia per un meccanismo molecolare ancora raro in letteratura

Il dato genetico più solido di questo lavoro è la conferma, in un nucleo familiare del tutto indipendente da quelli originariamente descritti, della medesima duplicazione di 23.420 bp identificata da Simioni et al. [130] nelle famiglie A e B. La famiglia di questo studio (famiglia S) rappresenta quindi, ad oggi, uno dei pochissimi pedigree indipendenti in cui questa specifica alterazione è stata caratterizzata in modo esteso, e la sua provenienza geografica — l'Italia

nord-orientale, come le famiglie originarie — è compatibile con l'ipotesi di effetto fondatore già avanzata da Simioni et al. [130] sulla base dell'aplotipo condiviso e della stima di un antenato comune risalente a circa 13 generazioni (≈ 350 anni) fa. Sebbene questo lavoro non abbia condotto un'analisi aplo-tipica indipendente per confermare la parentela remota con le famiglie A e B — un'indagine che esulava dagli obiettivi dello studio — la ricorrenza della stessa duplicazione in una terza famiglia della stessa area geografica rafforza indirettamente, per numerosità di osservazioni indipendenti, l'ipotesi che non si tratti di un evento mutazionale privato isolato, ma di una variante ricorrente e regionalmente diffusa, la cui reale prevalenza nella popolazione trombofilica del Nord-Est Italia rimane verosimilmente sottostimata.

Dal punto di vista meccanicistico, il lavoro conferma indirettamente — riproponendo nella famiglia S lo stesso *pattern* biochimico già dimostrato sperimentalmente da Simioni et al. mediante saggi reporter con luciferasi [130] — che la duplicazione agisce come un riarrangiamento *cis*-attivo di tipo *gain-of-function* a carico della regione regolatoria a monte del gene *F8*, aumentando la trascrizione piuttosto che alterando la sequenza amminoacidica della proteina matura. Nonostante non sia stato condotto nessuno studio di caratterizzazione della proteina o del mRNA derivanti dal riarrangiamento genico, come invece è stato fatto per il *F8* Aurora, le evidenze finora riportate suggeriscono che la duplicazione *F8* Padova non modifichi la struttura del fattore circolante, e quasi sicuramente nemmeno la sua attività, che risulta infatti sempre proporzionale ai livelli ematici. Per spiegare questo risultato sono state avanzate tre ipotesi:

1. nonostante la duplicazione in oggetto, la trascrizione avviene a partire dalla copia del promotore più a valle, generando quindi un corretto trascritto primario;

2. il secondo esone 1 a valle potrebbe non presentare un sito accettore di splicing, quindi, se anche si avesse la trascrizione del primo esone, questo verrebbe agganciato al sito accettore a monte dell'esone 2, eliminando la seconda copia dell'esone 1;
3. la trascrizione incorpora entrambe le copie dell'esone 1, che vengono entrambe tradotte in un precursore aberrante; tuttavia, codificando l'esone 1 per una sequenza amminoacidica a monte del dominio A₁ e rimossa durante i tagli proteolitici che precedono l'immissione in circolo, il risultante fattore circolante presenta struttura inalterata.

È un meccanismo concettualmente distinto, e complementare, rispetto a quello del *F8* Aurora recentemente descritto da Wischmeyer et al. [144] e caratterizzato a livello biochimico da Morris et al. [146]: mentre *F8* Padova produce più FVIII (guadagno di funzione quantitativo, dosaggio-dipendente), *F8* Aurora produce una quantità normale di una proteina con un'aumentata funzionalità, con un'aumentata affinità per il FIXa attivato che la rende relativamente resistente alla regolazione fisiologica mediata dalla proteina C attivata (guadagno di funzione qualitativo). Il confronto fra i due meccanismi è uno degli aspetti concettualmente più rilevanti: entrambe le varianti convergono sullo stesso esito clinico — un fenotipo trombofilico severo, esordiente in età relativamente giovane — partendo da due strategie biochimiche opposte (*quanto* FVIII circola contro *quanto efficacemente* funziona), a riprova che il gene *F8*, classicamente associato quasi esclusivamente al versante emorragico della patologia coagulativa (emofilia A), può generare fenotipi trombotici attraverso più di una via molecolare.

6.3 Il fenotipo biochimico e funzionale

Il quadro di laboratorio osservato nella Famiglia S riproduce fedelmente le caratteristiche biochimiche già descritte per il *F8* Padova nel lavoro di Simioni et al. [130]: valori di FVIII attività stabilmente elevati (dato confermato su prelievi ripetuti, ad esempio nella probanda della famiglia S: 482,9% a marzo 2025, 364,6% a giugno 2025 in corso di terapia anticoagulante ridotta, 498,0% a dicembre 2025), accompagnati da un aumento pressoché proporzionale dell'antigene, in un contesto di vWF sostanzialmente nella norma — un dettaglio che esclude un'elevazione secondaria e vWF-dipendente del FVIII (come accadrebbe, ad esempio, in una reazione di fase acuta) e depone per un meccanismo primario a carico del gene *F8* stesso. È interessante, e coerente con l'eterogeneità clinica tipica delle malattie X-linked a espressione variabile nelle femmine eterozigoti, che il soggetto III-7 mostri un'attività di FVIII sensibilmente più bassa (183,1%) rispetto agli altri portatori pur essendo geneticamente positiva: si suggerisce, in maniera plausibile, che questo possa riflettere i suoi livelli di vWF relativamente più bassi rispetto agli altri familiari, a conferma di come il fenotipo biochimico finale risulti dalla combinazione fra l'effetto primario della duplicazione e la restante variabilità individuale — inclusa, verosimilmente, l'inattivazione X non casuale, meccanismo già chiamato in causa nella famiglia B di Simioni et al. per spiegare la variabilità di espressione fra portatrici [130]. Il test funzionale globale di tromboelastometria (ROTEM) aggiunge elementi qualitativamente coerenti con uno stato emostatico spostato verso l'ipercoagulabilità.

6.4 Il fenotipo clinico e la penetranza: un genotipo necessario ma non sufficiente

Il dato clinico più rilevante della famiglia S — 4 eventi tromboembolici documentati su 6 portatori, in un range di età di esordio molto ampio (17, 31, 39 e 59 anni) — conferma quanto già descritto nelle famiglie A e B di Simioni et al. [130]: la duplicazione *F8* Padova si associa a un fenotipo trombofilico con penetranza incompleta ed età-dipendente. La curva di Kaplan-Meier (Figura 5.21), pur con i limiti discussi criticamente più sotto, illustra bene questo concetto: la proporzione libera da eventi nei portatori (Famiglie S, A e B) scende sotto il 60% già entro i 31 anni di età, un decorso nettamente più sfavorevole di quello dei non portatori, nessuno dei quali ha finora manifestato eventi. È altrettanto significativo, tuttavia, che l'ampiezza dell'intervallo di età di esordio osservato (17-59 anni, un range di oltre quattro decenni all'interno della stessa famiglia) precluda qualunque tentativo di predizione individuale basata sul solo genotipo. Un'osservazione puntuale, ma clinicamente istruttiva, riguarda il soggetto II-4: pur presentando uno dei livelli di FVIII:C più elevati dell'intera famiglia (498%), ha manifestato un solo evento trombotico, provocato (infezione da SARS-CoV-2), senza recidive né necessità di interventi — il punteggio di severità clinica più basso possibile fra i soggetti con evento noto. Questo singolo caso, più della correlazione complessiva fra FVIII e severità, rende concreto un principio sostenuto finora: il livello plasmatico di FVIII, per quanto marcatamente elevato, non è di per sé un buon predittore individuale né dell'insorgenza né della gravità della malattia trombotica in un singolo portatore. La penetranza osservata è verosimilmente il risultato dell'interazione fra il genotipo primario, fattori acquisiti e scatenanti (contraccezione ormonale nel caso di II-2, gravidanza

per I-2, infezione da SARS-CoV-2 per II-4 — tutti e tre elementi della triade di Virchow già richiamata nell'Introduzione), l'eventuale coeredità di altri fattori trombofilici (come osservato nella famiglia B di Simioni et al., dove la concomitanza di fattore V Leiden sembra anticipare l'età di esordio) e, nelle portatrici eterozigoti, l'inattivazione del cromosoma X — meccanismi che questo lavoro non aveva gli strumenti per indagare direttamente, ma che rappresentano la spiegazione biologicamente più plausibile della variabilità osservata.

6.5 Confronto con la letteratura e originalità del contributo

Prima di questo lavoro, il *F8* Padova era documentato in due famiglie originarie [130]; il *F8* Aurora, meccanicisticamente distinto, in un singolo paziente [145, 147]. Questa caratterizzazione della Famiglia S aggiunge quindi un pedigree indipendente — e, per numero di soggetti genotipizzati e ampiezza della caratterizzazione clinico-laboratoristico-funzionale, uno dei più estesi fra quelli pubblicati finora — a un *corpus* di letteratura ancora estremamente limitato, trattandosi di un'entità descritta per la prima volta solo nel 2021. Il confronto diretto fra le età di esordio delle diverse coorti (Famiglia S, mediana 35 anni; Famiglia A, mediana 43 anni; Famiglia B con fattore V Leiden concomitante, mediana 22,5 anni, Figura 5.20) non mostra differenze statisticamente significative — atteso, data la numerosità — ma la sua sola rappresentazione grafica offre un primo, seppur ancora provvisorio, quadro comparativo fra famiglie indipendenti portatrici della stessa alterazione genomica, un esercizio raramente possibile per varianti mendeliane rare descritte da meno di un lustro. Il caso Aurora offre invece un utile contrappunto:

l'esordio *dalla nascita* e l'esito fatale documentato per quel singolo paziente suggeriscono — senza che i dati disponibili permettano di più che un'ipotesi — che un guadagno di funzione qualitativo (*F8 Aurora*) possa tradursi in un fenotipo clinicamente più severo e a esordio più precoce di un guadagno di funzione quantitativo puro come il *F8 Padova*, un'ipotesi meccanicisticamente plausibile (un'alterata regolazione dell'inattivazione da APC agisce in modo più efficiente sull'intera cascata rispetto a un semplice eccesso di substrato) che meriterebbe verifica in casistiche più ampie qualora altri pazienti *Aurora* venissero identificati.

6.6 Limiti dello studio

In primo luogo, la numerosità — 9 soggetti nella sola Famiglia S, un massimo di 18-19 aggregando tutte le famiglie pubblicate — rende qualunque analisi statistica formale strutturalmente sottopotenziata: un risultato non significativo in questo lavoro va inteso quasi sempre come *non dimostrabile con questi numeri*, non come *assente*. In secondo luogo, i membri di una stessa famiglia non sono osservazioni indipendenti, condividendo fondo genetico, ambiente e in parte le circostanze cliniche di accertamento — una violazione dell'assunzione di indipendenza comune a tutti i test statistici impiegati. In terzo luogo, le famiglie di questo tipo di studio giungono all'osservazione clinica proprio perché uno o più membri hanno manifestato un evento trombotico severo o inatteso: qualunque stima di penetranza o di età di esordio da esse ricavata è quindi verosimilmente più sfavorevole (eventi più frequenti e più precoci) di quella che si osserverebbe in portatori identificati per screening a cascata in famiglie asintomatiche, e ancor più di quella attesa nella popolazione generale. Infine, diversi valori di FVIII e degli altri parametri emostatici

sono stati misurati in corso di terapia anticoagulante o in concomitanza di fattori scatenanti acquisiti (contraccezione ormonale, gravidanza, infezione), il che introduce un'ulteriore fonte di eterogeneità nei confronti quantitativi fra soggetti.

6.7 Implicazioni cliniche pratiche

Pur con i limiti discussi, questo lavoro permette di trarre alcune indicazioni di utilità pratica per la clinica, già in parte anticipate e qui riprese in chiave conclusiva.

- **Un *pattern* laboratoristico da riconoscere.** In un paziente con TEV ricorrente, idiopatico o refrattario alla terapia anticoagulante, un pannello trombofilico di primo livello nella norma e un'attività di FVIII marcatamente e persistentemente elevata (3-5 volte il limite superiore di norma) con antigene concordante e vWF non proporzionalmente aumentato — soprattutto se il quadro si ripete in più consanguinei attraverso più generazioni — dovrebbe indurre il sospetto di un'alterazione strutturale *gain-of-function del gene F8 (F8)*, non identificabile con il sequenziamento Sanger convenzionale.
- **Il percorso diagnostico corretto richiede l'analisi del numero di copie.** Poiché la duplicazione altera il dosaggio genico e non la sequenza codificante, il sequenziamento di routine degli esoni risulta per definizione negativo (come osservato in tutti i membri di questa famiglia); la tecnica MLPA è lo strumento di prima linea per identificare la variazione del numero di copie, da confermare — data l'impossibilità della MLPA di caratterizzare il riarrangiamento esatto fra le sonde — con una metodica a maggiore risoluzione (PCR con primer speci-

fici sulla giunzione di duplicazione, come eseguito in questo lavoro, o sequenziamento NGS).

- **Le implicazioni per il *counseling* genetico familiare differiscono da quelle classiche per *F8*.** A differenza di mutazioni del *F8* più diffuse come quella caratterizzante l'emofilia A, in cui le portatrici eterozigoti sono in genere clinicamente silenti o solo lievemente sintomatiche, nel *F8* Padova — trattandosi di una variante dominante che agisce sul dosaggio genico — le portatrici eterozigoti mostrano esse stesse livelli marcatamente elevati di FVIII e un rischio trombotico clinicamente rilevante, come confermato in questa famiglia da 4/5 portatrici femmine con FVIII:C > 450%. Il counseling familiare a cascata deve quindi essere offerto a tutti i consanguinei di primo e secondo grado indipendentemente dal sesso, con l'unica, importante eccezione dei figli maschi di un padre portatore (come correttamente non testato per il soggetto III-6 in questo lavoro), che per la localizzazione del gene sul cromosoma X non possono ereditare l'allele paterno alterato.
- **Ricadute gestionali per i portatori identificati.** La storia della probanda, con un primo evento in corso di terapia estroprogestinica e una successiva trombosi intra-stent nonostante terapia anticoagulante orale in range terapeutico, illustra due punti gestionali rilevanti: la contraccezione e le terapie ormonali estrogeniche dovrebbero essere considerate controindicate o quantomeno sconsigliate nelle portatrici note, analogamente a quanto già raccomandato per le altre trombofilie ad alto rischio; e la ricorrenza trombotica nonostante un'anticoagulazione adeguata, osservata non solo nella probanda ma già descritta nella famiglia indice originale [130], suggerisce che in questi pazienti possa es-

sere opportuna una valutazione individualizzata circa la durata (spesso indefinita) e, in casi selezionati, l'intensità della profilassi antitrombotica, oltre a una soglia bassa per la tromboprofilassi nei periodi di rischio acquisito aggiuntivo (chirurgia, immobilizzazione, gravidanza), anche nei portatori finora asintomatici.

- **Il livello di FVIII non può essere usato, da solo, per stratificare il rischio individuale.** Come dimostrato (il caso di II-4, l'assenza di correlazione fra FVIII e punteggio di severità, l'instabilità del modello predittivo), il grado di elevazione del FVIII non deve essere impiegato clinicamente come indicatore quantitativo di rischio individuale: la sorveglianza clinica dei portatori identificati deve fondarsi sulla storia clinica personale e familiare e sulla presenza di ulteriori fattori di rischio acquisiti, non su un valore soglia di FVIII.

6.8 Prospettive di ricerca future

Si è voluto indicare con chiarezza la direzione delle ricerche necessarie a trasformare le ipotesi qui generate in evidenze solide.

- *Un registro multicentrico collaborativo.* Il problema di fondo — la rarità della variante — non si risolve studiando più a fondo una singola famiglia, ma aggregando famiglie. La costituzione di un registro condiviso fra i centri che hanno finora identificato famiglie *F8* Padova o varianti funzionalmente analoghe (a partire dal gruppo di Padova che ha descritto la variante originaria [130] e dai gruppi che segnalano casi *F8* Aurora [145, 147]) permetterebbe, in tempi ragionevoli, di raggiungere numerosità sufficienti per analisi realmente informative su penetranza ed età di esordio.

- *Una meta-analisi con dati individuali dei pazienti (IPD).* La revisione della letteratura già condotta in questo lavoro rappresenta una base pronta per essere estesa a una meta-analisi formale con dati a livello individuale: mettendo a sistema i dati genetici, biochimici e clinici di tutti i portatori pubblicati di varianti *F8 gain-of-function*, sarebbe possibile per la prima volta calcolare stime di penetranza cumulativa e curve di sopravvivenza libera da eventi con un numero di soggetti sufficiente a generare intervalli di confidenza realmente informativi, correggendo esplicitamente per la struttura familiare dei dati (ad esempio con modelli a effetti misti o metodi robusti per dati *clusterizzati*) e, nei limiti del possibile, per il *bias* di accertamento discusso in questo lavoro.
- *Studi funzionali dedicati e adeguatamente dimensionati.* Un confronto formale dei parametri di aggregometria piastrinica e di tromboelastometria fra portatori e non portatori meriterebbe uno studio funzionale specificamente disegnato, con un calcolo dimensionale a priori basato sulla variabilità attesa di questi parametri, così da poter distinguere una reale differenza fenotipica dal semplice rumore di un campione troppo piccolo.
- *Indagare i modulatori della penetranza.* Il ruolo dell'inattivazione X non casuale nelle portatrici eterozigoti — chiamato in causa sia da Simioni et al. [130] sia, in questo lavoro, come possibile spiegazione della variabilità fra le portatrici femmine della Famiglia S — meriterebbe uno studio dedicato (ad esempio mediante saggio di inattivazione X sul gene HUMARA) per verificare se il grado di *skewing* correli effettivamente con il livello di FVIII o con la severità clinica individuale.

- *Rivalutare il ruolo dello screening per varianti strutturali di F8 nella trombofilia «inspiegata».* La conferma di una terza famiglia portatrice della stessa duplicazione, unita ai dati di prevalenza già emersi dallo screening mirato di Simioni et al. su 50 pazienti selezionati [130], suggerisce che questa e altre varianti strutturali analoghe di *F8* possano essere più diffuse di quanto la letteratura attuale, ancora limitata a poche famiglie, lasci supporre. Un sequenziamento genico negativo non esclude un'alterazione *gain-of-function* di tipo strutturale: nei pazienti con TEV inspiegato, FVIII marcatamente elevato e pannello trombofilico convenzionale negativo potrebbe essere ragionevole considerare l'analisi del numero di copie del gene *F8* come parte dell'iter diagnostico di secondo livello, un'ipotesi che uno studio di screening prospettico più ampio potrebbe testare formalmente.

6.9 Conclusioni

Questo studio conferma, in un nuovo pedigree, il quadro biochimico caratteristico del *F8* Padova e il fenotipo di trombofilia a penetranza incompleta ed età-dipendente già noto, offrendo un percorso diagnostico replicabile (MLPA seguita da PCR di conferma) per una condizione verosimilmente sottodiagnosticata. Le portatrici eterozigoti non sono clinicamente silenti, con ricadute pratiche sul *counseling* genetico familiare e sulla gestione clinica dei portatori — pur nei limiti intrinseci di un'inferenza tratta da una singola famiglia di queste dimensioni.

Bibliografia

- [1] Jon C. Aster Vinay Kumar Abul K. Abbas. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 10th. Elsevier, 2020.
- [2] Jana Pourová et al. «The machinery of healthy vasodilatation: an overview». In: *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 477 (giu. 2025), pp. 1135–1162. DOI: 10.1007/s00424-025-03096-2.
- [3] David GREEN. «Coagulation cascade». In: *Hemodialysis International* 10.S2 (2006), S2–S4. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>.
- [4] Alisina Shahi et al. «The incidence and economic burden of in-hospital venous thromboembolism in the United States». In: *The Journal of arthroplasty* 32.4 (2017), pp. 1063–1066.
- [5] Salar A Ahmed et al. «Prevalence of the prothrombin G20210A mutation among ischemic stroke patients». In: *Journal of cardiovascular and thoracic research* 12.3 (2020), p. 227.
- [6] Peter MacCallum, Louise Bowles e David Keeling. «Diagnosis and management of heritable thrombophilias». In: *Bmj* 349 (2014).
- [7] Marcello Di Nisio, Nick Van Es e Harry R Büller. «Deep vein thrombosis and pulmonary embolism». In: *The Lancet* 388.10063 (2016), pp. 3060–3073.
- [8] Maurizio G Abrignani et al. «COVID-19, vaccines, and thrombotic events: a narrative review». In: *Journal of Clinical Medicine* 11.4 (2022), p. 948.
- [9] Bilgen Dölek et al. «Molecular analysis of factor V Leiden, factor V Hong Kong, factor II G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, and A1298C mutations related to Turkish thrombosis patients». In: *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 13.4 (2007), pp. 435–438.
- [10] Mark Stecker et al. «Risk factors for DVT/PE in patients with stroke and intracranial hemorrhage». In: *The open neurology journal* 8 (2014), p. 1.
- [11] Reham Altwayan et al. «Comprehensive review of thrombophilia: pathophysiology, prevalence, risk factors, and molecular diagnosis». In: *Transfusion Clinique et Biologique* 32.2 (2025), pp. 228–244.
- [12] Andrew D Blann e Gregory YH Lip. «Venous thromboembolism». In: *Bmj* 332.7535 (2006), pp. 215–219.

- [13] Caio J Fernandes et al. «Cancer-associated thrombosis: the when, how and why». In: *European Respiratory Review* 28.151 (2019).
- [14] John D Cramer, Andrew G Shuman e Michael J Brenner. «Antithrombotic therapy for venous thromboembolism and prevention of thrombosis in otolaryngology–head and neck surgery: state of the art review». In: *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 158.4 (2018), pp. 627–636.
- [15] Jean M Connors. «Thrombophilia testing and venous thrombosis». In: *New England Journal of Medicine* 377.12 (2017), pp. 1177–1187.
- [16] Christina A Theochari et al. «Venous thromboembolism following major abdominal surgery for cancer: a guide for the surgical intern». In: *Current Pharmaceutical Design* 28.10 (2022), pp. 787–797.
- [17] Ghaleb Elyamany, Ali Mattar Alzahrani e Eman Bukhary. «Cancer-associated thrombosis: an overview». In: *Clinical Medicine Insights: Oncology* 8 (2014), CMO–S18991.
- [18] Richard H White. «The epidemiology of venous thromboembolism». In: *Circulation* 107.23_suppl_1 (2003), pp. I–4.
- [19] Silvy Laporte et al. «Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15 520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbólica venosa (RIETE) Registry». In: *Circulation* 117.13 (2008), pp. 1711–1716.
- [20] Marja K Puurunen et al. «Epidemiology of venous thromboembolism in the Framingham Heart Study». In: *Thrombosis research* 145 (2016), pp. 27–33.
- [21] Alexander GG Turpie et al. «GARFIELD-VTE: 6-month outcomes». In: *Res Pract Thromb Haemost* 1 (2017), pp. 1–15.
- [22] AA Khorana et al. «Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5.3 (2007), pp. 632–634.
- [23] Mikio Mukai e Toru Oka. «Mechanism and management of cancer-associated thrombosis». In: *Journal of Cardiology* 72.2 (2018), pp. 89–93.
- [24] Patrycja Sandra Zawadzka, Anna M Imiela e Piotr Pruszczyk. «The Interplay Between Obesity and Venous Thromboembolism: From Molecular Aspects to Clinical Issue». In: *International Journal of Molecular Sciences* 26.21 (2025), p. 10292.
- [25] Katrin Schäfer e Stavros Konstantinides. «Adipokines and thrombosis». In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 38.12 (2011), pp. 864–871.
- [26] Stavros Konstantinides et al. «Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis». In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24.11 (2004), pp. 2196–2201.
- [27] Claudia Dellas et al. «Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases C γ 2 and A2». In: *Thrombosis and haemostasis* 98.11 (2007), pp. 1063–1071.
- [28] A Corsonello et al. «Identifying pathways involved in leptin-dependent aggregation of human platelets». In: *International journal of obesity* 28.8 (2004), pp. 979–984.

- [29] Hisham S Elbatarny e Donald H Maurice. «Leptin-mediated activation of human platelets: involvement of a leptin receptor and phosphodiesterase 3A-containing cellular signaling complex». In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 289.4 (2005), E695–E702.
- [30] Haim D Danenberg et al. «Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein–transgenic mice». In: *Circulation* 108.5 (2003), pp. 512–515.
- [31] Glenys A Tennent et al. «Transgenic human CRP is not pro-atherogenic, pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE^{-/-} mice». In: *Atherosclerosis* 196.1 (2008), pp. 248–255.
- [32] Gil Yaron et al. «C-reactive protein promotes platelet adhesion to endothelial cells: a potential pathway in atherothrombosis». In: *British journal of haematology* 134.4 (2006), pp. 426–431.
- [33] Jianbo Wu et al. «C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance». In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28.4 (2008), pp. 698–704.
- [34] I Juhan-Vague e MC Alessi. «PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events». In: *Thrombosis and haemostasis* 78.07 (1997), pp. 656–660.
- [35] Laurence A Erickson et al. «Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene». In: *Nature* 346.6279 (1990), pp. 74–76.
- [36] Hisashi Kato et al. «Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor». In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26.1 (2006), pp. 224–230.
- [37] Takuhito Shoji et al. «Platelet activation is associated with hypoadiponectinemia and carotid atherosclerosis». In: *Atherosclerosis* 188.1 (2006), pp. 190–195.
- [38] WQ Wang et al. «Adiponectin inhibits hyperlipidemia-induced platelet aggregation via attenuating oxidative/nitrative stress». In: *Physiological Research* 60.2 (2011), p. 347.
- [39] Yvonne Linicus et al. «Vena cava compression syndrome in patients with obesity presenting with edema and thrombosis». In: *Obesity* 24.8 (2016), pp. 1648–1652.
- [40] EL Simpson et al. «Venous thromboembolism in pregnancy and the puerperium: incidence and additional risk factors from a London perinatal database». In: *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 108.1 (2001), pp. 56–60.
- [41] Dimitrios Varrias et al. «Venous thromboembolism in pregnancy: challenges and solutions». In: *Vascular health and risk management* (2023), pp. 469–484.
- [42] Michelangelo Sartori et al. «Proximal and isolated distal deep vein thrombosis and Wells score accuracy in hospitalized patients». In: *Internal and emergency medicine* 14.6 (2019), pp. 941–947.
- [43] P Pottier et al. «Immobilization and the risk of venous thromboembolism. A meta-analysis on epidemiological studies». In: *Thrombosis research* 124.4 (2009), pp. 468–476.
- [44] Michelangelo Sartori, Elisabetta Favaretto e Benilde Cosmi. «Relevance of immobility as a risk factor for symptomatic proximal and isolated distal deep vein thrombosis in acutely ill medical inpatients». In: *Vascular Medicine* 26.5 (2021), pp. 542–548.

- [45] Sébastien Weill-Engerer et al. «Risk factors for deep vein thrombosis in inpatients aged 65 and older: a case-control multicenter study». In: *Journal of the American Geriatrics Society* 52.8 (2004), pp. 1299–1304.
- [46] MJ Engbers et al. «The contribution of immobility risk factors to the incidence of venous thrombosis in an older population». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12.3 (2014), pp. 290–296.
- [47] RA Van Adrichem et al. «Below-knee cast immobilization and the risk of venous thrombosis: results from a large population-based case-control study». In: *Journal of thrombosis and haemostasis* 12.9 (2014), pp. 1461–1469.
- [48] Sreeram V Ramagopalan et al. «Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study». In: *BMC medicine* 9.1 (2011), p. 1.
- [49] Bengt Zöller et al. «Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden». In: *The Lancet* 379.9812 (2012), pp. 244–249.
- [50] Jaroslav Cermak et al. «C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor». In: *Blood* (1993).
- [51] Steven R Lentz, Manuel Tsiang e J Evan Sadler. «Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms». In: *Blood* (1991).
- [52] G Archipoff et al. «Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester». In: *Biochemical journal* 273.3 (1991), pp. 679–684.
- [53] Hiromichi Tamaki e Atul Khasnis. «Venous thromboembolism in systemic autoimmune diseases: a narrative review with emphasis on primary systemic vasculitides». In: *Vascular Medicine* 20.4 (2015), pp. 369–376.
- [54] MEHMET Agirbasli et al. «The effects of TNF alpha inhibition on plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatological disorders.» In: *Clinical and experimental rheumatology* 24.5 (2006), pp. 580–583.
- [55] Joachim Pircher et al. «Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2». In: *Arthritis research & therapy* 14.5 (2012), R225.
- [56] Elisabeth Koch et al. «The Endothelial Tyrosine Phosphatase SHP-1 Plays an Important Role for Vascular Haemostasis in TNF α -Induced Inflammation In Vivo». In: *Mediators of inflammation* 2013.1 (2013), p. 279781.
- [57] Ashima Makol et al. «Etanercept and venous thromboembolism: a case series». In: *Journal of medical case reports* 4.1 (2010), p. 12.
- [58] SP Ardoin, JC Shanahan e DS Pisetsky. «The role of microparticles in inflammation and thrombosis». In: *Scandinavian journal of immunology* 66.2-3 (2007), pp. 159–165.
- [59] Tobias A Fuchs et al. «Extracellular DNA traps promote thrombosis». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.36 (2010), pp. 15880–15885.

- [60] O Egeberg. «Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia». In: *Thrombosis and Haemostasis* 13.02 (1965), pp. 516–530.
- [61] Danny Cohn et al. «Thrombophilia testing for prevention of recurrent venous thromboembolism». In: *Cochrane Database of systematic reviews* 1 (2009).
- [62] Uri Seligsohn e Aharon Lubetsky. «Genetic susceptibility to venous thrombosis». In: *New England Journal of Medicine* 344.16 (2001), pp. 1222–1231.
- [63] Katarzyna Mayger, Christelle Orlando e Beverley J Hunt. «Physiological Anti-coagulant Deficiencies: Pathogenesis, Diagnosis, and Clinical Implications». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2026).
- [64] American College of Obstetricians, Gynecologists et al. «ACOG Practice Bulletin No. 197: inherited thrombophilias in pregnancy». In: *Obstetrics and gynecology* 132.1 (2018), e18–e34.
- [65] Muhammad Saboor et al. «Exploring antithrombin: insights into its physiological features, clinical implications and analytical techniques». In: *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 35.2 (2024), pp. 43–48.
- [66] Yuhri Miyawaki et al. «Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance». In: *New England Journal of Medicine* 366.25 (2012), pp. 2390–2396.
- [67] Y Jin et al. «Identification and function probing of an antithrombin III β conformation-specific antibody». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14.2 (2016), pp. 356–365.
- [68] Øivind Andersen et al. «Salmon antithrombin has only three carbohydrate side chains, and shows functional similarities to human β -antithrombin». In: *European Journal of Biochemistry* 267.6 (2000), pp. 1651–1657.
- [69] V Karlaftis et al. «Beta (β)-antithrombin activity in children and adults: implications for heparin therapy in infants and children». In: *Journal of Thrombosis and haemostasis* 12.7 (2014), pp. 1141–1144.
- [70] Salman Adil. «Frequency of hereditary thrombophilia: an AKUH experience». In: *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* (2004).
- [71] Nadir Ali, Muhammad Ayyub e Saleem Ahmed Khan. «High prevalence of protein C, protein S, antithrombin deficiency, and Factor V Leiden mutation as a cause of hereditary thrombophilia in patients of venous thromboembolism and cerebrovascular accident». In: *Pakistan journal of medical sciences* 30.6 (2014), p. 1323.
- [72] Carlos Bravo-Pérez et al. «Molecular and clinical characterization of transient antithrombin deficiency: a new concept in congenital thrombophilia». In: *American journal of hematology* 97.2 (2022), pp. 216–225.
- [73] Morris A Blajchman et al. «Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency». In: *Blood* (1992).
- [74] Jong-Ha Yoo et al. «A heparin binding site Arg79Cys missense mutation in the SERPINC1 gene in a Korean patient with hereditary antithrombin deficiency». In: *Annals of Clinical & Laboratory Science* 41.1 (2011), pp. 89–92.

- [75] Christelle Orlando et al. «Antithrombin heparin binding site deficiency: a challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia». In: *Thrombosis research* 135.6 (2015), pp. 1179–1185.
- [76] Rendrik F Franco e Pieter H Reitsma. «Genetic risk factors of venous thrombosis». In: *Human genetics* 109.4 (2001), pp. 369–384.
- [77] Peyman Dinarvand e Karen A Moser. «Protein C deficiency». In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 143.10 (2019), pp. 1281–1285.
- [78] Teresa Fidalgo et al. «Familial thrombotic risk based on the genetic background of Protein C Deficiency in a Portuguese Study». In: *European Journal of Haematology* 95.4 (2015), pp. 294–307.
- [79] NA Goldenberg e Marilyn J MANCO-JOHNSON. «Protein C deficiency». In: *Haemophilia* 14.6 (2008), pp. 1214–1221.
- [80] Anne C. Dykes et al. «A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state». In: *British journal of haematology* 113.3 (2001), pp. 636–641.
- [81] Paul A Kyrle e Sabine Eichinger. «Deep vein thrombosis». In: *The Lancet* 365.9465 (2005), pp. 1163–1174.
- [82] Zsuzsanna Bereczky, Kitty Bernadett Kovács e László Muszbek. «Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game». In: *The Gruyter Brill* (2010).
- [83] Ted Koster et al. «Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study». In: *The Lancet* 342.8886-8887 (1993), pp. 1503–1506.
- [84] Pelle G Lindqvist et al. «Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss—a possible evolutionary selection mechanism». In: *Thrombosis and haemostasis* 59.01 (1998), pp. 69–73.
- [85] Francesco Bernardi et al. «A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 90.4 (1997), pp. 1552–1557.
- [86] WP Chan et al. «A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 91.4 (1998), pp. 1135–1139.
- [87] Keiji Nogami et al. «Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 123.15 (2014), pp. 2420–2428.
- [88] B Pezeshkpoor et al. «Identification and functional characterization of a novel F5 mutation (Ala512Val, FVBonn) associated with activated protein C resistance». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14.7 (2016), pp. 1353–1363.
- [89] Jody L Kujovich. «Prothrombin thrombophilia». In: *Europe PMC* (2021).
- [90] Joaquín V Gonzalez et al. «Prevalence and geographical variation of prothrombin G20210A mutation in patients with cerebral vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis». In: *PLoS One* 11.3 (2016), e0151607.

- [91] Michael W Mosesson. «Fibrinogen and fibrin structure and functions». In: *Journal of thrombosis and haemostasis* 3.8 (2005), pp. 1894–1904.
- [92] Philippe De Moerloose, Alessandro Casini e Marguerite Neerman-Arbez. «Congenital fibrinogen disorders: an update». In: *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Vol. 39. 06. Thieme Medical Publishers. 2013, pp. 585–595.
- [93] F Haverkate e M Samama. «Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia». In: *Thrombosis and haemostasis* 73.01 (1995), pp. 151–161.
- [94] Astrid van Hylekama Vlieg et al. «High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 95.12 (2000), pp. 3678–3682.
- [95] YuXin Ma et al. «Complete F9 gene deletion, duplication, and triplication rearrangements: implications for factor IX expression and clinical phenotypes». In: *Thrombosis and Haemostasis* 124.04 (2024), pp. 374–385.
- [96] Paolo Simioni et al. «X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua)». In: *New England Journal of Medicine* 361.17 (2009), pp. 1671–1675.
- [97] Concetta T Ammollo et al. «Factor IX-Padua enhances the fibrinolytic resistance of plasma clots». In: *Thrombosis and haemostasis* 112.02 (2014), pp. 226–232.
- [98] Wenman Wu et al. «Factor IX alteration p. Arg338Gln (FIX Shanghai) potentiates FIX clotting activity and causes thrombosis». In: *Haematologica* 106.1 (2021), pp. 264–268.
- [99] Turkan Turkut Tan et al. «A unique case of thrombophilia: the role of F9 gene duplication and increased factor IX activity in cerebral venous thrombosis». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 21.10 (2023), pp. 2913–2916.
- [100] Jane Gitschier et al. «Characterization of the human factor VIII gene». In: *Nature* 312.5992 (1984), pp. 326–330.
- [101] J Corden et al. «Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes». In: *Science* 209.4463 (1980), pp. 1406–1414.
- [102] Hung Do et al. «Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells». In: *Journal of Biological Chemistry* 274.28 (1999), pp. 19587–19592.
- [103] Karen L Wion et al. «Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues». In: *Nature* 317.6039 (1985), pp. 726–729.
- [104] William I Wood et al. «Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones». In: *Nature* 312.5992 (1984), pp. 330–337.
- [105] Hong Fang, Leming Wang e Hongbao Wang. «The protein structure and effect of factor VIII». In: *Thrombosis research* 119.1 (2007), pp. 1–13.
- [106] Brad A McMullen et al. «Locations of disulfide bonds and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant human factor VIII (antihemophilic factor A)». In: *Protein science* 4.4 (1995), pp. 740–746.
- [107] Luigina Tagliavacca et al. «Identification and functional requirement of Cu (I) and its ligands within coagulation factor VIII». In: *Journal of Biological Chemistry* 272.43 (1997), pp. 27428–27434.

- [108] John F Healey et al. «Residues 484-508 Contain a Major Determinant of the Inhibitory Epitope in the A2 Domain of Human Factor VIII». In: *Journal of Biological Chemistry* 270.24 (1995), pp. 14505–14509.
- [109] Philip J Fay et al. «Factor VIIIA A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site.» In: *Journal of Biological Chemistry* 269.32 (1994), pp. 20522–20527.
- [110] S Paul Bajaj et al. «Factor IXa: factor VIIIA interaction: helix 330–338 of factor IXa interacts with residues 558–565 and spatially adjacent regions of the A2 subunit of factor VIIIA». In: *Journal of Biological Chemistry* 276.19 (2001), pp. 16302–16309.
- [111] Kirsty A Lapan e Philip J Fay. «Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIA». In: *Journal of Biological Chemistry* 272.4 (1997), pp. 2082–2088.
- [112] FJ Walker, D Scandella e PJ Fay. «Identification of the binding site for activated protein C on the light chain of factors V and VIII.» In: *Journal of Biological Chemistry* 265.3 (1990), pp. 1484–1489.
- [113] Gordon A Vehar et al. «Structure of human factor VIII». In: *Nature* 312.5992 (1984), pp. 337–342.
- [114] Carol A Fulcher, James R Roberts e Theodore S Zimmerman. «Thrombin proteolysis of purified factor VIII procoagulant protein: correlation of activation with generation of a specific polypeptide». In: (1983).
- [115] Debra D Pittman et al. «Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII». In: (1993).
- [116] N Bovenschen et al. «The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor». In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3.6 (2005), pp. 1257–1265.
- [117] Rachel T Barrow et al. «Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 95.2 (2000), pp. 564–568.
- [118] ML Liu e AR Thompson. «Factor VIII's C1 domain enhances C2 binding of factors IX/IXa, X/Xa and von Willebrand factor (vWf).» In: *Blood*. Vol. 96. 11. AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA. 2000, 489A–489A.
- [119] Dan Eaton, Henry Rodriguez e Gordon A Vehar. «Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity». In: *Biochemistry* 25.2 (1986), pp. 505–512.
- [120] PJ Lenting, OD Christophe e P Guéguen. «The disappearing act of factor VIII». In: *Haemophilia* 16.102 (2010), pp. 6–15.
- [121] Koen Mertens et al. «Factor VIII-factor IX interactions: molecular sites involved in enzyme-cofactor complex assembly». In: *Thrombosis and haemostasis* 82.08 (1999), pp. 209–217.

- [122] Gary E Gilbert et al. «Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs». In: *Journal of Biological Chemistry* 277.8 (2002), pp. 6374–6381.
- [123] Philip J Fay. «Factor VIII structure and function». In: *International journal of hematology* 83.2 (2006), pp. 103–108.
- [124] Keiji Nogami et al. «Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337–372 of the factor VIII heavy chain». In: *Journal of Biological Chemistry* 279.16 (2004), pp. 15763–15771.
- [125] Keiji Nogami et al. «Altered interactions between the A1 and A2 subunits of factor VIIIA following cleavage of A1 subunit by factor Xa». In: *Journal of Biological Chemistry* 278.3 (2003), pp. 1634–1641.
- [126] Keiji Nogami et al. «Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain». In: *Journal of Biological Chemistry* 280.18 (2005), pp. 18476–18487.
- [127] Andrew J Gale et al. «Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIA by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V». In: *Journal of Biological Chemistry* 283.24 (2008), pp. 16355–16362.
- [128] Stefan J Koppelman et al. «Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII». In: (1995).
- [129] Johnathan J Morris et al. «Factor IXa and factor X influence factor VIIIA stability and inactivation mechanisms in vitro and in vivo». In: *Blood* 146.18 (2025), pp. 2259–2271.
- [130] Paolo Simioni et al. «Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia». In: *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 137.17 (2021), pp. 2383–2393.
- [131] Robert D Langdell, Robert H Wagner e Kenneth M Brinkhous. «Effect of anti-hemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure». In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 41.4 (1953), pp. 637–647.
- [132] Arnold Clauss. «Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens». In: *Acta haematologica* 17.4 (1957), pp. 237–246.
- [133] C Boyer et al. «A new method for the estimation of protein C by ELISA». In: *Thrombosis research* 36.6 (1984), pp. 579–589.
- [134] J Tous et al. «New automated chemiluminescent VWF: Ag and VWF: RCo assays: preliminary analytical and clinical performance». In: *J Thromb Haemost* 7.Suppl 2 (2009), p. 1143.
- [135] S Loizou et al. «Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results». In: *Clinical and experimental immunology* 62.3 (1985), p. 738.
- [136] Peter Baker et al. «Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis». In: *British journal of haematology* 191.3 (2020), pp. 347–362.

- [137] Jonathan Casper et al. «The UCSC genome browser database: 2026 update». In: *Nucleic Acids Research* 54.D1 (2026), pp. D1331–D1335.
- [138] Ted Koster et al. «Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis». In: *The Lancet* 345.8943 (1995), pp. 152–155.
- [139] Roderik A Kraaijenhagen et al. «High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism». In: *Thrombosis and haemostasis* 83.01 (2000), pp. 5–9.
- [140] Paul A Kyrle et al. «High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism». In: *New England Journal of Medicine* 343.7 (2000), pp. 457–462.
- [141] P Vince Jenkins et al. «Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis». In: *British journal of haematology* 157.6 (2012), pp. 653–663.
- [142] Mia Golder, Jeffrey Mewburn e David Lillicrap. «In vitro and in vivo evaluation of the effect of elevated factor VIII on the thrombogenic process». In: *Thrombosis and haemostasis* 109.01 (2013), pp. 53–60.
- [143] Chihiro Sugita et al. «Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor». In: *Thrombosis and haemostasis* 110.07 (2013), pp. 62–75.
- [144] Joshua T Wischmeyer et al. «A naturally occurring gain-of-function mutation in factor VIII». In: *New England Journal of Medicine* 393.7 (2025), pp. 722–724.
- [145] Rosella Famà et al. «Deciphering the Ets-1/2-mediated transcriptional regulation of F8 gene identifies a minimal F8 promoter for hemophilia A gene therapy». In: *Haematologica* 106.6 (2020), p. 1624.
- [146] Johnathan J Morris et al. «Factor VIII Aurora: A Naturally Occurring Gain of Function FVIII Variant with Enhanced FIXa Affinity». In: *Blood* (2026).