

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**Studio genetico dei fattori della coagulazione nelle malattie emorragiche e
trombotiche congenite**

Relatore: Chiar.mo Prof. Giulio Ceolotto

Correlatore: Dr.ssa Alessandra Giannella

Laureanda: Laura Nikolovska

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABSTRACT	9
INTRODUZIONE	11
1. Aspetti fisiologici della coagulazione	11
2. Aspetti patologici nella coagulazione.....	16
2.1 Malattie emorragiche.....	18
2.2 Malattie trombotiche	19
3. Diagnosi delle METC.....	19
4. Terapia farmacologica	22
4.1 Anticoagulanti parenterali.....	23
4.2 Anticoagulanti orali	27
4.3 Fibrinolitici	29
4.4 Inibitori della fibrinolisi	30
4.5 Antiaggreganti piastrinici	32
SCOPO DELLO STUDIO.....	37
MATERIALI E METODI.....	39
1. Pazienti.....	39
2. Estrazione del DNA.....	39
3. Controllo quantitativo e qualitativo del DNA purificato.....	40
4. Analisi genetica mediante tecnologia NGS.....	40
5. Preparazione delle librerie	41
5.1 Preparazione dei campioni.....	41
5.2 Ligazione degli adattatori	42

5.3 Cleanup post ligazione.....	42
5.4 Amplificazione mediante PCR.....	42
5.5 Cleanup post PCR	42
5.6 Quantificazione delle librerie	43
5.7 Controllo della qualità e delle dimensioni delle librerie.....	43
6. Arricchimento e cattura dei frammenti di DNA.....	44
6.1 Costruzione di un pool di librerie	46
6.2 Reazione di ibridazione	47
6.3 Lavaggio delle biglie di streptavidina.....	47
6.4 Reazione di cattura	47
6.5 Lavaggi con i buffers	48
6.6 PCR post cattura	48
6.7 Purificazione del prodotto di amplificazione	48
6.8 Quantificazione del pool di librerie	49
7. Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS).....	49
7.1 Preparazione pool finale.....	49
7.2 Caricamento su NGS.....	50
7.3 Controllo della qualità della corsa NGS	51
7.4 Analisi bioinformatica.....	52
7.5 Validazione mediante sequenziamento Sanger.....	53
RISULTATI.....	55
1. Validazione del pannello di 33 geni per l'analisi genica in pazienti affetti da METC	55

1.1 Q-score.....	55
1.2 Cluster density	56
2. Analisi bioinformatica	57
3. Coverage	57
4. Analisi delle mutazioni germinali	58
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	65
1. Gene <i>F2</i>	65
2. Gene <i>F8</i>	67
3. Gene <i>F9</i>	68
4. Gene <i>PLG</i>	69
5. Gene <i>PROS1</i>	70
6. Gene <i>VWF</i>	71
BIBLIOGRAFIA	75

ABSTRACT

Introduzione: Le malattie emorragiche e trombotiche congenite (METC) sono un gruppo di patologie causate da disfunzione di uno o più fattori della coagulazione o del numero e della funzione delle piastrine, con conseguenze fenotipiche che variano dalla tendenza al sanguinamento spontaneo alla trombosi venosa profonda o arteriosa. Le METC comprendono difetti coagulativi rari dei fattori della coagulazione, le emofilie, la malattia di Von Willebrand, e degli enzimi che regolano la fibrinolisi. In questi anni, l'analisi molecolare e genetica sulle malattie METC ha avuto un forte impulso nell'ambito scientifico, diagnostico e terapeutico soprattutto grazie allo sviluppo di piattaforme di sequenziamento di nuova generazione, Next Generation Sequencing (NGS).

Scopo di questo lavoro è stato quello di a. portare alla validazione di un pannello genetico di sequenziamento con tecnologia NGS in pazienti affetti da METC; b. l'analisi in silico delle varianti genetiche identificate al fine di predirne il ruolo biologico e la relazione con il trattamento farmacologico.

Pazienti e Metodi: Sono stati reclutati 103 pazienti affetti da METC seguiti presso il Centro delle Malattie Trombotiche ed Emorragiche dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova. Per ogni partecipante è stato raccolto un campione di sangue venoso per l'estrazione del DNA. Le librerie per il sequenziamento NGS sono state preparate mediante frammentazione del DNA, ligazione degli adattatori, arricchimento e cattura dei frammenti degli acidi nucleici mediante specifiche sonde studiate per un pannello di geni target selezionati. Il pannello genico è costituito da 861 sonde che coprono la porzione esonica e border intronico-esonico di 33 geni. Il sequenziamento NGS è stato eseguito mediante la piattaforma NextSeq-550 e l'analisi bioinformatica delle sequenze nucleotidiche mediante pipelines e workflows specifici per l'identificazione di mutazioni germinali. Le mutazioni missenso sono state analizzate in silico mediante specifici softwares per prevedere la patogenicità delle varianti genetiche individuate.

Risultati: Sono state identificate mutazioni missenso note, potenzialmente patologiche in circa il 73% dei pazienti affetti da METC. In alcuni soggetti sono state identificate delle mutazioni non note come la mutazione c.1621C>T del gene F2 con sostituzione amminoacidica p.Arg541Trp, la mutazione c.1303G>A del gene F2 con sostituzione amminoacidica p. Glu435Lys e la mutazione c.1368T>C del gene PLAT (Attivatore del plasminogeno coinvolto nella via della fibrinolisi) con sostituzione amminoacidica p.Leu287Pro. Ulteriori considerazioni sono emerse dai risultati ottenuti dallo screening genetico in relazione alla terapia farmacologica.

Conclusioni: I risultati ottenuti dimostrano che la tecnologia di sequenziamento NGS rappresenta una valida strategia per l'analisi delle varianti genetiche presenti nelle forme rare delle malattie emorragiche e trombotiche e contribuiscono a consolidare la conoscenza relativa alle basi genetiche di tale patologia. Inoltre, lo studio del ruolo fisiopatologico di queste mutazioni potrà fornire utili informazioni per lo sviluppo di efficaci terapie farmacologiche.

INTRODUZIONE

1. Aspetti fisiologici della coagulazione

L'emostasi consiste in un bilancio fisiopatologico dato da una serie di reazioni biochimiche e cellulari che è deputato al mantenimento dell'integrità dei vasi sanguigni e della fluidità del sangue. Il processo emostatico può essere suddiviso in 4 fasi, che possono interagire tra di loro in quanto interconnesse. Si inizia con una fase vascolare, poi una fase piastrinica, una coagulativa e infine una fibrinolitica.

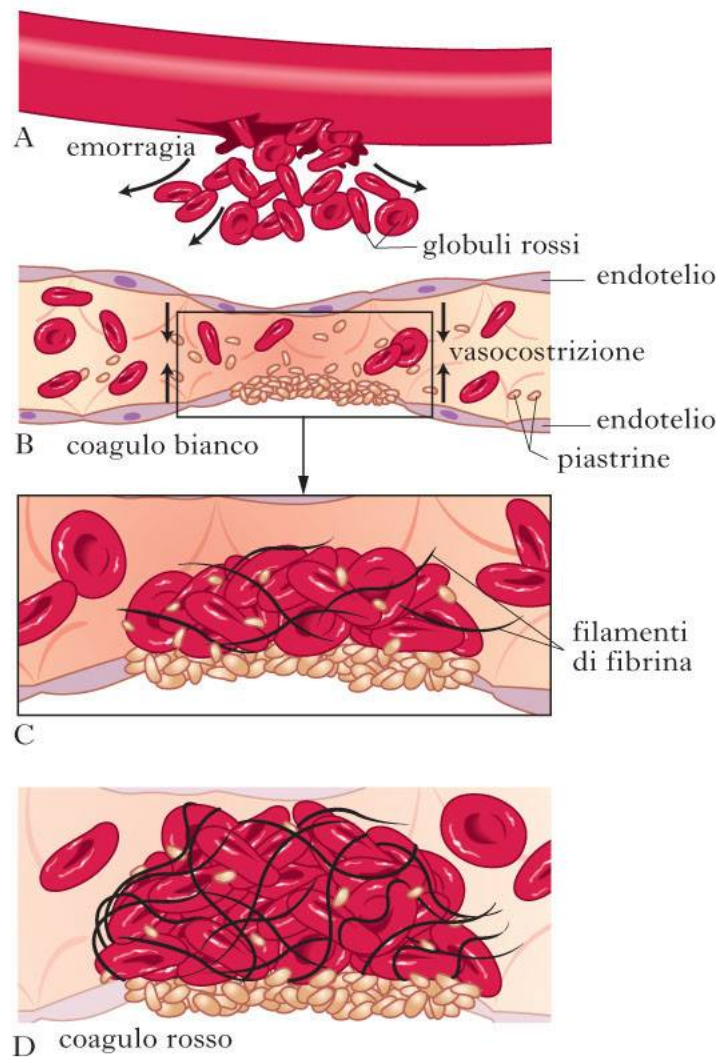


Figura 1. Processo emostatico

Nel processo coagulativo sono coinvolti i vasi e i costituenti della parete vascolare (endotelio e cellule muscolari), le piastrine, la cascata coagulativa e il sistema

fibrinolitico. Questo è un meccanismo autoregolato che si attiva in caso di lesione vascolare, può presentare due manifestazioni cliniche come un'incontrollata attivazione intravasale dell'emostasi con trombosi o un deficit del sistema emostatico presentando sindromi emorragiche.

La prima fase dell'emostasi consiste in una contrazione vascolare nella zona lesa, i meccanismi sottostanti lavorano in maniera più efficiente nei vasi con tunica media, una spessa tunica vascolare presentante cellule muscolari lisce. Il processo di vasocostrizione riduce momentaneamente il sanguinamento. Questo meccanismo avviene per diversi fattori: risposta delle cellule muscolari al trauma, liberazione di sostanze vasocostrittrici a livello locale da parte delle cellule endoteliali e poi delle piastrine.

Le piastrine sono cellule secernenti prive di nucleo di dimensioni 1-4 μm , si trovano in circolo nei vasi e non aderiscono alla parete vascolare. L'attività della membrana piastrinica consiste in un processo procoagulante, permette nella fase di coagulazione l'interazione tra i vari fattori. La risposta delle piastrine ad uno stimolo avviene per un'interazione tra la membrana, i granuli e il citoscheletro. Si divide nelle seguenti fasi:

- adesione e attivazione piastrinica;
- cambiamento della forma;
- secrezione piastrinica;
- aggregazione piastrinica.

In quest'ultimo step si forma il tappo piastrinico, avviene in poco tempo dalla lesione lieve e costituisce l'emostasi primaria. Nel caso di lesioni a vasi di portata maggiore si attiva il sistema della coagulazione, richiedendo più tempo per la formazione del tappo piastrinico e viene definita emostasi secondaria.

La fase di coagulazione è un processo emostatico che porta alla formazione del coagulo insolubile di fibrina. I fattori della coagulazione sono serino-proteasi (enzimi che presentano la serina nel sito catalitico) presenti nel sangue in forma di zimogeni

(proenzima) i quali vengono attivati a cascata fino alla formazione della maglia di fibrina, fanno eccezione il fattore V ed il fattore VIII (cofattori), ed il fibrinogeno, che non sono serino proteasi. Intervengono in modo critico nel processo coagulativo gli ioni Ca^{2+} e i fosfolipidi delle superfici cellulari, in particolare i fosfolipidi della superficie delle piastrine che vanno sotto il nome di fattore piastrinico 3 (PF3). Tutti i fattori della coagulazione, ad eccezione del fattore III (fattore tissutale), sono normalmente presenti nel plasma in forma inattiva, vengono poi attivati e designati con lo stesso numero e l'aggiunta di un "a" piccolo in basso a destra.

La sintesi dei fattori di coagulazione avviene nel fegato, mentre le cellule endoteliali sintetizzano il fattore di von Willebrand (vWF), che veicola nel sangue il FVIII della coagulazione. La vitamina K è essenziale non tanto per la sintesi epatica di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX, X) e di due glicoproteine, le proteine C ed S con attività anticoagulante, quanto per integrare la loro struttura con un carbossile dopo che la sintesi epatica è stata completata. Infatti, la vitamina K interferisce nella via sintetica di questi fattori a livello della carbossilazione dei loro residui di acido glutammico ad acido γ -carbossi-glutammico per opera della carbossilasi vitamina K-dipendente. In assenza di questa vitamina i fattori continuano ad essere sintetizzati ma sono biologicamente inattivi, denominati PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence). La presenza di residui γ -carbossi-glutammici è necessaria per il legame di queste proteine agli ioni calcio ed ai fosfolipidi di membrana per una corretta attività proteasica.

La cascata coagulativa si suddivide in via intrinseca ed estrinseca per poi collegarsi alla via comune.

formazione della trombina dalla protrombina (FII) avviene a partire dall'azione proteolitica della protrombinasi, complesso multimolecolare dato dal FX_a interagendo con FV_a , i fosfolipidi e gli ioni calcio. La fibrina, invece, si forma in seguito a diverse tappe: scissione proteolitica delle molecole di fibrinogeno in fibrina da parte della trombina, polimerizzazione della fibrina in una soluzione gelatinosa di fibrina e stabilizzazione da parte del fattore $XIII_a$. Il fibrinogeno è una glicoproteina ad alto peso molecolare formata da due unità ciascuna costituita da tre catene peptidiche α , β , γ , la trombina scinde i gruppi terminali rilasciando così un monomero di fibrina che darà origine al coagulo di fibrina stabilizzato dal fattore $XIII_a$.

I meccanismi di regolazione della coagulazione risultano fisiologicamente necessari per evitare la formazione di coaguli spontaneamente e impedire eccessi coagulativi sproporzionati. Tra questi sistemi sono presenti il flusso sanguigno che è fondamentale nel controllo dell'emostasi in quanto promuove l'allontanamento e la diluizione dei fattori di coagulazione attivati. Inoltre, di fondamentale importanza gli inattivatori delle proteasi attive, inibitori fisiologici in grado di inibire fattori di coagulazione e cofattori attivati, tra questi l'antitrombina III, le proteine C ed S. L'antitrombina III glicoproteina della famiglia delle serpine (inibitori serina-proteasi) forma un complesso irreversibile con la trombina ed alcune altre esterasi seriniche rendendole inattive; è in grado di interagire anche con altri fattori della coagulazione inibendoli come X_a , XI_a , XII_a e IX_a , plasmino e callicreina. Mentre le proteine C ed S mettono in luce il ruolo fondamentale dell'endotelio nel controllo dell'emostasi; la proteina C per svolgere la sua attività inibitoria deve essere attivata, questo avviene grazie all'interazione tra la trombina e la trombomodulina presente sulle superfici endoteliali passando da un'attività procoagulante a una anticoagulante, l'attività viene potenziata dalla proteina S. Il ruolo della proteina C è quello di distruggere proteolicamente i fattori V e VIII della coagulazione, i fattori attivati vengono distrutti rapidamente.

Il sistema fibrinolitico è l'ultimo passaggio del processo emostatico che rappresenta il meccanismo fondamentale per la dissoluzione del coagulo di fibrina, sistema multienzimatico analogo a quello coagulativo. I componenti sono gli attivatori del plasminogeno, l'attivatore tissutale (tPA), plasminogeno, plasmina, inibitori. L'attivatore del plasminogeno si occupa di convertire il plasminogeno a plasmina, può essere di due tipologie in base alle cellule di partenza, quello urochinasico e quello tessutale. Il plasminogeno è una glicoproteina prodotta a livello del fegato e solo una parte viene attivata attraverso un taglio proteolitico formando così la plasmina; quest'ultima potrà successivamente degradare il fibrinogeno, la fibrina sia nella forma iniziale che stabilizzata. L'inibizione, invece, si verifica sia per gli attivatori del plasminogeno che della plasmina, consistono in un sistema regolatorio per equilibrare i processi fisiologici della fibrinolisi.

2. Aspetti patologici nella coagulazione

I processi emostatici, in alcune condizioni, possono presentare alterazioni nel lavoro dei fattori della coagulazione, proteine C ed S, come anche a livello della fibrinolisi, traducendosi in condizioni patologiche.

Nella regolazione emostatica si possono manifestare delle condizioni patologiche in cui la risposta fisiologica risulta sbilanciata. Si può verificare uno scompenso delle funzioni dei fattori della coagulazione portando così ad episodi emorragici. Nel caso contrario con situazioni di ipercoagulabilità la cascata coagulativa si muoverà in modo tale da formare quelli che sono i trombi.

Le malattie emorragiche e trombotiche congenite (METC) sono un gruppo di malattie, appartenenti alle malattie cardiovascolari, molto studiate in quanto il profilo genetico dei pazienti affetti può variare in base alle condizioni cliniche che si manifestano.

Nei riguardi delle METC si svolgono diagnosi e terapie indicate per le condizioni patologiche in studio. Si prediligono controlli mirati per il profilo genetico e per le

caratteristiche della coagulazione. Risultano necessari dei monitoraggi frequenti per la terapia anticoagulante e per la terapia delle malattie emorragiche.

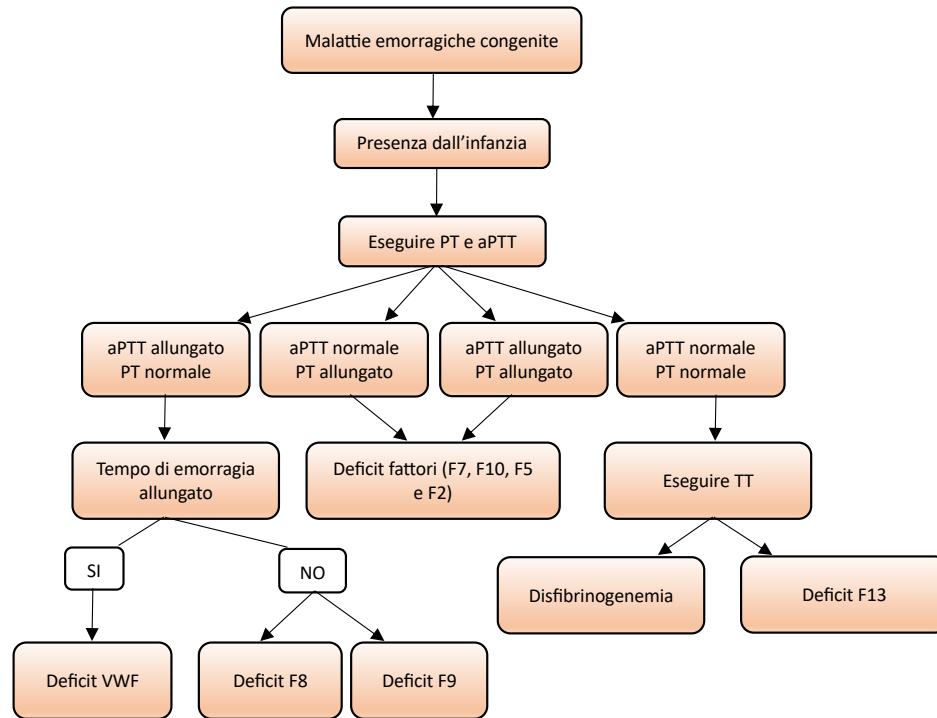


Figura 3. Algoritmo malattie emorragiche congenite

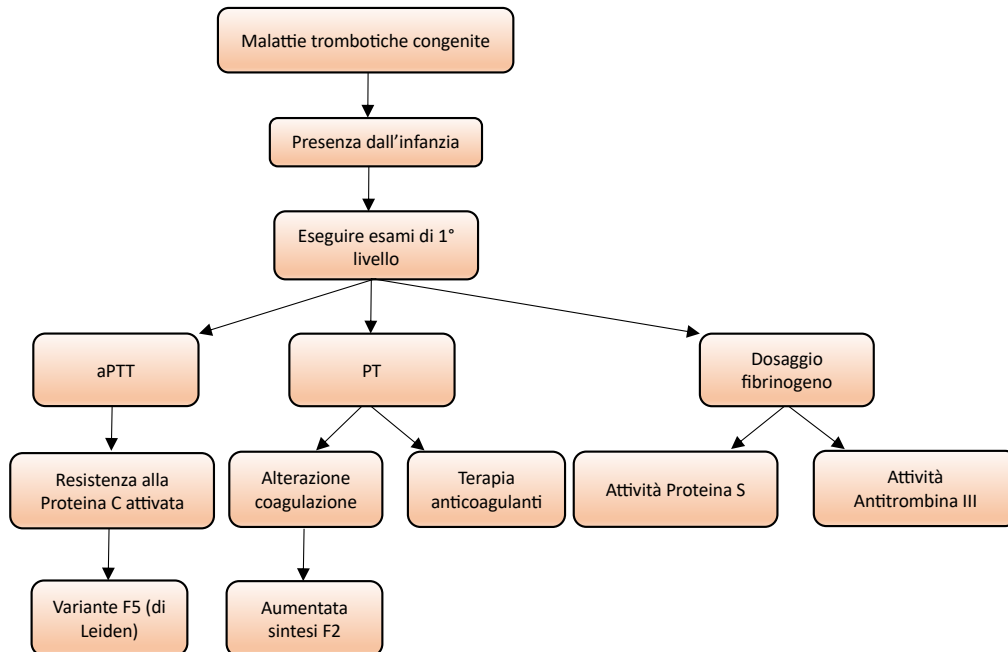


Figura 4. Algoritmo malattie trombotiche congenite

2.1 Malattie emorragiche

Le malattie emorragiche possono essere date da una carenza dei fattori di coagulazione e della via fibrinolitica, una conta anomala delle piastrine oppure una carenza della funzione piastrinica e queste portano ad un sanguinamento anomalo e ad una serie di patologie associate. La carenza dei fattori di coagulazione e della regolazione fibrinolitica si possono verificare in stati congeniti o acquisiti, anche se in questo secondo caso in maniera ridotta. Gli stati congeniti si possono verificare come deficit dei diversi fattori come il fattore VIII che si presenta come emofilia di tipo A. Un altro esempio è il deficit di vitamina K o l'assunzione di warfarin che determinano una ridotta concentrazione dei fattori II, VII, IX, X e delle proteine C ed S.

L'alterata funzionalità o l'alterazione del numero piastrinico portano a malattie classificate come qualitative o quantitative, di quest'ultima fanno parte la piastrinopenia e la trombocitosi. La piastrinopenia si può manifestare in seguito ad un'aumentata distruzione delle piastrine, dato da cause immuni e non immuni o ridotta produzione di piastrine. La trombocitosi risulta meno comune e può manifestarsi in forma reattiva con aumento transitorio del numero di piastrine o neoplasie. Le malattie qualitative si presentano come anomalie della funzionalità piastrinica con una conta fisiologica di piastrine; ad esempio, una disfunzione del fattore di von Willebrand può causare un difetto nella funzionalità piastrinica.

Altre cause che si possono verificare sono le anomalie intra-piastriniche, le condizioni congenite sono molto rare, ad esempio la malattia di Bernard-Soulier, mentre sono più comuni quelle acquisite come quelle farmaco-indotte (aspirina e clopidogrel). ⁽¹⁾

2.2 Malattie trombotiche

La trombosi consiste in uno stato di ipercoagulabilità che porta alla formazione di un trombo, cioè una formazione solida costituita da componenti del sangue quali piastrine, globuli rossi, globuli bianchi e fibrina, che può occludere il vaso sanguigno causando ischemia o ictus. Questo stato può essere congenito, ovvero dato da fattori genetici, oppure acquisita, conseguente ad altre patologie.

Le forme ereditarie possono derivare da carenze a livello, in particolar modo delle proteine ad azione anticoagulante come proteina C, proteina S, antitrombina III, che risultano essere a bassa prevalenza, intorno lo 0,2-0,4% e per l'antitrombina 0,01-0,02%. Quelle conseguenti alla resistenza della proteina C attivata, quasi sempre dovute alla mutazione del fattore V di Leiden, sono ad alto rischio e presenti nel 3-5% della popolazione caucasica. Altre malattie trombotiche ad alta prevalenza sono la mutazione della protrombina G20210A, responsabile dell'aumentata sintesi di F2. Mentre la carenza di plasminogeno risulta rara e non direttamente associata alla trombosi.

Gli stati di ipercoagulazione acquisita possono insorgere successivamente ad altre condizioni cliniche sfavorevoli, come da tumori maligni, immobilizzazione prolungata, obesità, fumo, viaggi prolungati, uso contraccettivi orali, può essere definito dal test diagnostico specifico per la sindrome degli anticorpi antifosfolipidi.

La presenza di una di queste condizioni cliniche non determina necessariamente l'instaurarsi di un episodio trombotico. È possibile che si verifichi un episodio se ad una delle condizioni cliniche citate si aggiunge un secondo evento concomitante, che può provocare a sua volta un evento trombotico. ⁽¹⁾

3. Diagnosi delle METC

Gli stati di malattie emorragiche e di ipercoagulabilità vengono analizzati nei pazienti che presentano una storia personale o familiare per le METC; generalmente è

consigliabile svolgere quest'analisi con uno specifico pannello genetico per la ricerca dei marcatori delle patologie.

Per una corretta esecuzione dei test il sangue prelevato dovrà essere reso temporaneamente incoagulabile grazie all'azione di una soluzione tamponata di sodio citrato, per poi essere facilmente ricoagulato per valutare il tempo di formazione del coagulo fisiologicamente. In questo caso risulta di fondamentale importanza che le provette vengano riempite correttamente per la perfetta uscita dei test coagulativi, in caso contrario non sarà garantita l'esatta riuscita.

Per gli stati di malattie emorragiche e di ipercoagulabilità congeniti possono essere eseguiti diversi test:

- Resistenza alla proteina C attivata: se dovesse emergere dai suoi valori una riduzione di essa verrà eseguita l'analisi genetica per verificare la presenza del fattore V di Leiden;
- Protrombina G20210A con un'analisi genetica del promotore;
- Attività di Proteina S e antitrombina III con determinazione della loro attività e della loro concentrazione attraverso metodi immunologici;
- Deficienza del fattore di Von Willebrand con scarsa aggregazione piastrinica e manifestazioni emorragiche, con verifica della conta e/o della funzionalità piastrinica

La resistenza alla Proteina C attivata può essere analizzata tramite test di laboratorio aPCR (Protein C Resistance activated), consiste nella misura del tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) nella quale viene aggiunta una quantità nota di Proteina C esogena. Nel caso di presenza di una variante nella molecola del fattore V (di Leiden) previene l'inattivazione da parte della Proteina C attivata.

L'aPTT è espresso come rapporto fra il tempo in secondi, del paziente e un tempo medio ottenuto da un campione di soggetti non affetti da alterazioni di coagulazione o in terapia con farmaci anticoagulanti, secondo la reazione:

$$\mathbf{aPTT = aPTT \text{ paziente (secondi) / aPTT plasma pool}}$$

Confrontando paziente sano e malato nell'analisi dell'aPTT, nei sani la proteina C degrada velocemente il fattore Va che si trova nel plasma; quindi, sia in presenza che in assenza di Proteina C esogena si riscontra un cut-off superiore a 2.2. Mentre nei malati, pazienti con ipercoagulabilità, a causa di variante del fattore V, la proteina C non è in grado di degradare il fattore Va.

Un altro test particolarmente svolto è il tempo di protrombina (PT), sia per valutare la via estrinseca della cascata coagulativa e sia nel caso di assunzione da parte dei pazienti di anticoagulanti inibitori della vitamina K per il loro monitoraggio. Al campione prelevato e conservato, si aggiungono tromboplastina e cloruro di calcio per valutare il tempo di formazione del coagulo. Il PT è espresso come rapporto fra il PT, espresso in secondi, del paziente e un tempo medio ottenuto da un campione di soggetti non affetti da alterazione della coagulazione o in terapia con farmaci anticoagulanti, secondo la reazione:

$$\text{PT} = \frac{\text{PT paziente (secondi)}}{\text{PT plasma pool}}$$

Oltre a questi risultano importanti come analisi anche i test per il dosaggio del fibrinogeno (Fbg) e il tempo di trombina (TT); nel primo, il fibrinogeno è una proteina facente parte del sistema coagulativo che si presenta a livello del plasma, per la sua valutazione possono essere utilizzate diverse metodologie.

Il metodo Claus, il più utilizzato, che deriva da una variazione della PT, dato che un eccesso e quindi un'aggiunta di trombina consente un rapido passaggio dal fibrinogeno alla fibrina, permette di valutare la quantità di proteina presente nel plasma. Può essere utilizzato anche il metodo immunologico (antigenico) per cui uno specifico anticorpo si andrà a legare e riconoscerà la proteina. Quest'ultimo metodo utilizzato anche nella determinazione dell'attività della Proteina S e dell'antitrombina III con specifici anticorpi.

Il TT, invece, risulta essere un test coagulativo per la valutazione della carenza congenita o acquisita di fibrinogeno, questo test è particolarmente sensibile alla presenza di eparina non frazionata.

Altri esami di laboratorio sono incentrati sul controllo quantitativo e qualitativo delle piastrine. La conta piastrinica permette una verifica del numero di piastrine mediante l'esame emocromocitomerico o emocromo. Il numero di piastrine a livello della circolazione sanguigna varia tra i 150000 e i 400000 per mm^3 , ed ha un rinnovamento ogni 10 giorni. Il rischio di sanguinamento si presenta nel momento in cui la conta piastrinica scende al di sotto dei 10000-20000 per mm^3 di sangue. Nei controlli qualitativi si verifica la funzionalità piastrinica: l'esame consiste nella valutazione della capacità delle piastrine di aggregarsi e formare un coagulo in un campione di sangue. L'esecuzione del test consiste nell'aggiunta di un aggregante al plasma, si considera la turbidimetria del campione, nel caso di forte aggregazione la soluzione sarà limpida. La deficienza del fattore di Von Willebrand consiste in una malattia emorragica ereditaria che presenta un'anomalia a livello quantitativo, strutturale o funzionale del VWF. La diagnosi di deficienza di VWF è multipla, data la scarsa o assente aggregazione, il valore d'analisi di aPTT risulta allungato. Si valutano la conta piastrinica che può dimostrare una significativa riduzione, ad indicare una carenza della proteina. Inoltre, nello specifico, il rilevamento della qualità, quindi funzionalità piastrinica valutando la capacità d'aggregazione. ⁽²⁾

4. Terapia farmacologica

La terapia farmacologica prescelta consiste nel controllo degli eventi trombotici con l'uso di anticoagulanti che riducono la formazione di fibrina, antiaggreganti piastrinici inibiscono l'attivazione e/o aggregazione piastrinica e agenti fibrinolitici che permettono la degradazione della fibrina. Questi però aumentano il rischio emorragico, in questo caso la terapia indicata è l'uso di inibitori della fibrinolisi, una terapia ancora in corso di studio sono le terapie genetiche per contrastare l'eccessivo sanguinamento in pazienti a rischio emorragico. ⁽³⁾

4.1 Anticoagulanti parenterali

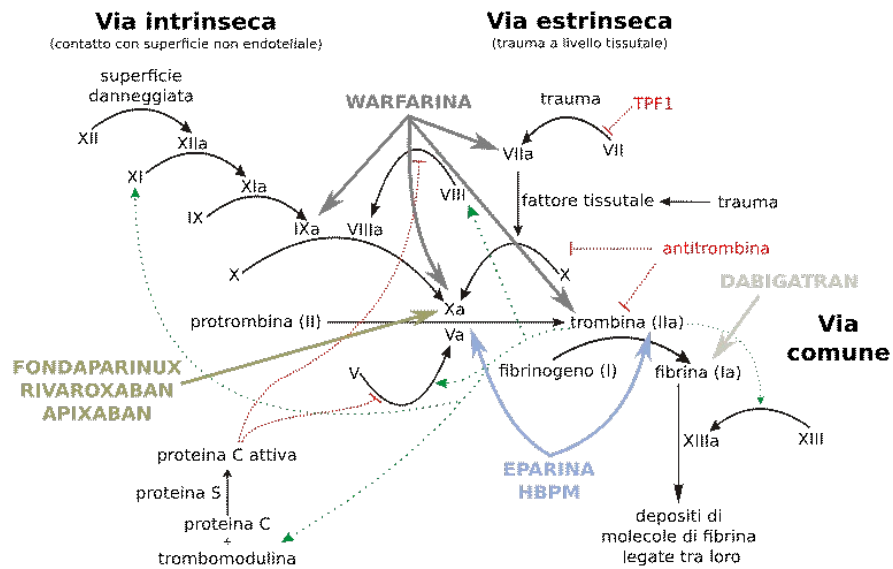


Figura 5. Azione anticoagulanti sulla cascata coagulativa

Gli anticoagulanti sono distinti in base alla via di somministrazione in parenterali e orali.

L'eparina è il principale anticoagulante parenterale, un glucosamminoglicano localizzato nei granuli secretori dei mastociti, sintetizzato da precursori UDP-zucchero, polimero di residui alternati di acido D-glucuronico e di N-acetil-D-glucosamina. Risultano, inoltre, d'uso comune anche i derivati dell'eparina come le eparine a basso peso molecolare e fondaparinux.

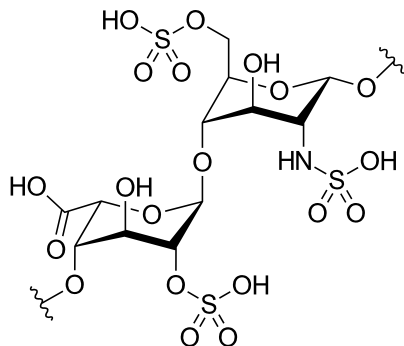


Figura 6. Struttura chimica dell'eparina

L'eparina e i derivati si legano all'antitrombina e accelerano la velocità d'inibizione delle proteasi della coagulazione. L'inibizione ha luogo quando la proteasi attacca uno specifico legame peptidico Arg-Ser nel sito dell'antitrombina e rimane bloccata. Il sito di legame al quale l'antitrombina si lega all'eparina consiste in uno specifico residuo di glucosammina 3-O-solfata di una sequenza pentasaccaridica, si induce così una modificazione conformazionale dell'antitrombina per rendere più accessibile il legame con le proteasi. Inoltre, permette l'aumento del tasso di inibizione del fattore X_a, ma non aumentando la velocità di inibizione della trombina. Quest'ultimo è possibile con le eparine con una lunghezza di almeno 18 unità saccaridiche, le quali riescono a legare oltre all'antitrombina anche la trombina. Nel caso dell'eparina un dosaggio elevato può portare ad un'azione ulteriore che consiste nell'interferire nell'aggregazione piastrinica, prolungando così il tempo di emorragia. Nelle eparine a basso peso molecolare e il fondaparinux l'effetto antiaggregante piastrinico è molto ridotto. L'eparina e i suoi derivati si utilizzano principalmente nella terapia iniziale di trombosi venosa ed embolia polmonare per la loro rapidità d'azione, spesso associati ad anticoagulanti orali antagonisti della vitamina K, come il warfarin, che presenta un effetto terapeutico dopo qualche giorno. Si possono utilizzare questi anticoagulanti parenterali anche in un controllo iniziale di angina instabile o nell'infarto miocardico acuto. Le eparine a basso peso molecolare e il fondaparinux sono le terapie maggiormente consigliate rispetto le infusioni continuate di eparina, perché offrono il vantaggio di dosi fisse, una o due al giorno, e senza necessità di monitoraggio della coagulazione. Restano comunque fondamentali le somministrazioni a livello sottocutaneo di eparina a basso dosaggio per le condizioni di prevenzione della trombosi venosa profonda postoperatoria ed embolia polmonare in pazienti chirurgici. Rispetto alle forme orali degli anticoagulanti, quelli parenterali non attraversano la barriera placentare e sono quindi preferibili in gravidanza, risulta consigliabile la sospensione almeno 24 ore prima del parto per minimizzare il sanguinamento postpartum.

Le terapie in questione non essendo assorbibili dalla mucosa intestinale hanno la necessità di essere somministrate per via parenterale. L'eparina si somministra per infusione endovenosa continuata o intermittente ogni 4-6 ore con azione immediata, l'emivita varia in base al dosaggio e può arrivare fino a 5 ore per 800 unità/Kg. Inoltre, si ritiene venga eliminata principalmente dal reticolo endoteliale ed è presente in minime quantità nelle urine. Oppure, un'altra tipologia di somministrazione, per iniezione sottocutanea ogni 8-12 ore con una biodisponibilità variabile e un input d'azione ritardato di 1-2 ore; mentre le derivate dell'eparina si assorbono più uniformemente ed hanno un'emivita più lunga che varia tra le 4-6 ore per quelle a basso peso molecolare e fino a 17 ore per il fondaparinux. Questi dati che sono strutturati in catene più corte vengono eliminate in maniera importante a livello renale, risultano controindicati in pazienti con insufficienza renale ed una clearance della creatinina inferiore a 30 ml/min, inoltre possono condurre ad emorragie. La terapia per il trattamento della tromboembolia venosa si presta ad una dose fissa di 5000 unità, o regolata in base al peso corporeo, con un'aggiunta da 800 a 1600 unità all'ora che vengono erogate per infusione. Questa viene controllata attraverso la misurazione dell'aPTT che si mantiene tra le 2-3 volte il valore medio normale ed il range terapeutico da mantenere a livello plasmatico di eparina è di 0.3-0.7 unità/ml dosando l'anti-fattore X_a.

Le eparine a basso peso molecolare sono enoxaparina, dalteparina, tinzaparina, ardeparina, nadroparina e reviparina, queste hanno un'azione distinta tra loro e non sono facilmente intercambiabili per i loro effetti.

La dose di farmaco necessaria varia molto in base alle concentrazioni ematiche delle proteine leganti l'eparina, dato che queste vanno ad impedire il legame eparina-antitrombina. In questo caso un evento di resistenza può presentarsi nell'uso di eparina, in particolare modo a dosaggi elevati, per dei livelli troppo bassi di aPTT nei pazienti trattati e la possibilità che questi abbiano una deficienza di antitrombina

congenita o acquisita. Per le eparine derivate il problema si presenta molto raramente per lo scarso legame alle proteine plasmatiche differenti dall'antitrombina.

Il principale effetto avverso dato dall'uso di eparina sono le manifestazioni emorragiche, queste si riscontrano nel 1-5% dei pazienti trattati, l'incidenza di questi eventi si riduce con l'uso di eparine a basso peso molecolare. Spesso l'evento emorragico risulta connesso ad un intervento chirurgico, un trauma, ma nella maggior parte dei casi in forma contenuta. Si potrebbero verificare delle emorragie potenzialmente letali, sarà importante somministrare nel più breve tempo possibile un'infusione endovenosa lenta di protamina solfato (polipeptidi basici) in una concentrazione adeguata a neutralizzare la presenza di eparina, se prolungato si otterrà un effetto anticoagulante interagendo con piastrine, fibrinogeno ed altre proteine plasmatiche. Un altro effetto avverso la trombocitopenia indotta dall'uso di eparina con riduzione del 50% della conta piastrinica in confronto al pretrattamento, questo si verifica nello 0.5% dei pazienti in terapia con eparina standard, anche se si può instaurare anche con le eparine derivate.

Altri anticoagulanti parenterali usati in caso di impossibilità d'uso dell'eparina e dei suoi derivati sono lepirudina, desirudina, bivalirudina, argatroban.

La lepirudina derivato ricombinante dell'irudina, questo un inibitore diretto della trombina è presente a livello delle ghiandole salivari della sanguisuga medicinale. Approvata per il trattamento della trombocitopenia indotta da eparina, inoltre non presenta antidoti.

L'argatroban è un composto sintetico con struttura che riprende quella della L-arginina, si lega reversibilmente al sito catalitico della trombina. Può risultare problematico nel caso si scelga una terapia con anticoagulante orale, nello specifico warfarin, perché il tempo di protrombina risulterà prolungato. (3)

4.2 Anticoagulanti orali

Il warfarin è l'anticoagulante orale d'elezione nel trattamento preventivo della tromboembolia, è un antagonista della vitamina K, a causa dei diversi effetti collaterali sta venendo a mano a mano sostituito dai nuovi anticoagulanti orali.

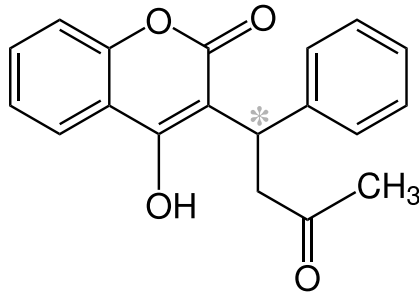


Figura 7. Struttura chimica del warfarin

La funzione della vitamina K in forma ridotta, insieme poi ad anidride carbonica e ossigeno molecolare, consiste nel favorire la carbossilazione di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX e X) e le proteine C ed S in residui di γ -carbossiglutamato capaci di legare il Ca^{2+} . La carbossilazione induce un'ossidazione della vitamina K nel riformare l'eossido iniziale, per cui sarà necessario da parte dell'enzima vitamina K eossido-reduttasi (VKOR) rigenerare la vitamina K ridotta. L'azione del farmaco in questione sarà quella di inibire a dosi terapeutiche l'enzima VKOR del 30-50% per evitare la formazione della vitamina K prodotta dal fegato.

Gli anticoagulanti orali non agiscono sull'attività delle molecole carbossilate in circolo per l'emivita lunga dei fattori della coagulazione, in particolare del fattore II, e l'effetto farmaceutico si registra dopo diversi giorni dall'inizio della terapia.

Il dosaggio iniziale consigliato negli adulti è di 2-5 mg al giorno per 2-4 giorni, per poi variare tra 1-10 mg al giorno basato sulle analisi del PT rielaborato sul rapporto internazionale normalizzato (INR). La biodisponibilità è per la maggior parte completa con l'uso del farmaco per le diverse vie di somministrazione. Le compresse prodotte hanno diverse velocità di dissoluzione, questo modifica anche la velocità e quantità di farmaco assorbita; può essere influenzato negativamente anche dalla presenza di alimenti nell'apparato digerente. Il warfarin si struttura in due enantiomeri e l'S è 3-5

volte più potente dell'R-warfarin, la trasformazione in metaboliti inattivi è data dall'enzima CYP2C9 e questi vengono escreti nell'urina e nelle feci. Il picco della concentrazione plasmatica è raggiunto dopo 2-8 ore per mantenere un'emivita che oscilla tra le 25-60 ore, questo porta ad una durata d'azione media del farmaco di 2-5 giorni.

Il warfarin è un farmaco che può andare in contro facilmente ad interazioni con altri farmaci e sostanze. Infatti, numerosi fattori influenzano la riduzione dell'effetto anticoagulante, con una possibile riduzione del PT:

- legame con la colestiramina nel tratto gastrointestinale provoca una riduzione dell'assorbimento del farmaco;
- aumento del metabolismo del farmaco a livello degli enzimi epatici, specialmente CYP2C9, a causa di barbiturici, rifampicina;
- alimentazione ricca di vitamina K;
- aumento del rischio emorragico dato da un ridotto metabolismo per inibizione CYP2C9 da parte di amiodarone, antifungini azolici, clopidogrel, fluoxetina, isoniazide, come anche l'uso di diuretici dell'ansa e del valproato che portano ad una rottura del legame con le proteine plasmatiche;

Le emorragie sono il principale effetto tossico dovuto all'assunzione del warfarin, è necessario che i pazienti si rechino con regolarità al centro TAO per la misurazione dei valori PT in relazione all'INR. L'incidenza degli episodi è del 3% e l'INR dev'essere mantenuta tra 2 e 3. Altre problematiche possono essere la comparsa di difetti congeniti e aborto nelle donne in gravidanza, la necrosi cutanea indotta molto rara che si caratterizza per lesioni cutanee 3-10 giorni dopo l'inizio della terapia.

Gli antagonisti della vitamina K si utilizzano nelle trombosi venose acute o embolia polmonare per la prevenzione della progressione o ricaduta, dopo o in contemporanea all'uso di eparina; sono consigliati in prevenzione di alcuni interventi chirurgici.

I nuovi anticoagulanti orali agiscono in maniera più diretta nei confronti dei fattori della coagulazione.

Il dabigatran blocca reversibilmente il sito attivo della trombina, viene preferita la sua forma a profarmaco, dabigatran etexilato.

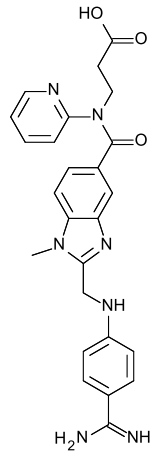


Figura 8. Struttura chimica del dabigatran

Data la risposta anticoagulante prevedibile a dosi fisse non risultano necessari i controlli di routine; infatti, ha un'emivita di 12-14 ore con biodisponibilità orale del 6% e il picco d'azione in 2 ore. Preferito per la prevenzione dell'ictus in pazienti con fibrillazione atriale.

L'inibizione del fattore X_a può essere conseguente all'uso, ad esempio, del rivaroxaban che ha una buona biodisponibilità dell'80%, un picco d'azione in 3 ore e un'emivita di 7-11 ore. Anch'esso non richiede monitoraggio della coagulazione, consigliato nella profilassi di alcuni pazienti chirurgici per evitare tromboembolia venosa. (3)

4.3 Fibrinolitici

I farmaci fibrinolitici o per la terapia trombolitica seguono il percorso della via della fibrinolisi favorendo la dissoluzione dei trombi.

L'ateplasi è prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante e ripercorre l'azione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA). Una serina proteasi che agisce come

debole attivatore del plasminogeno in assenza di fibrina. Infatti, necessita del legame con la fibrina ed ha un'azione molto più rapida rispetto all'azione del plasminogeno in circolo. Il t-PA viene utilizzato per la lisi dei trombi in pazienti trattati per infarto miocardico acuto o ictus ischemico acuto, l'emivita della proteina è di circa 5 minuti metabolizzato a livello epatico. La terapia prevista consiste nell'assunzione con bolo endovenoso di 15 mg, poi intorno ai 0.75 mg/Kg di peso corporeo per 30 minuti e nell'ora seguente 0.5 mg/Kg fino 35 mg cumulativi.

La streptochinasi è stata prodotta partendo dallo streptococco β -emolitico, farmaco utilizzato raramente per ottenere la fibrinolisi. Proteina di 47 000 Da priva di attività enzimatica, si lega e forma un complesso con il plasminogeno, questo induce una modificazione conformazionale esponendo il sito attivo del plasminogeno così da facilitare la formazione della plasmina.

I fattori fibrinolitici o trombolitici manifestano una certa tossicità, causando episodi emorragici che possono derivare dalla lisi della fibrina in coaguli emostatici oppure una fibrogenolisi data dalla formazione sistemica di plasmina. Infatti, si riscontrano diverse controindicazioni a questa terapia: pregressa emorragia intracranica, sospetta dissecazione aortica, ipertensione non controllata, gravidanza, uso di warfarin e INR>1.7. (3)

4.4 Inibitori della fibrinolisi

Gli inibitori della fibrinolisi possono essere utilizzati per un controllo della regolazione fibrinolitica permettendo, in questo caso, di ridurre gli eventi emorragici.

L'acido aminocaproico, con struttura simile alla lisina, interagisce con i siti per la lisina sul plasminogeno e sulla plasmina, inibendo l'azione di quest'ultima di legarsi alla fibrina.

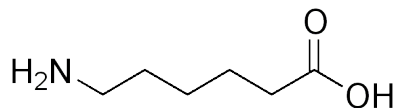


Figura 9. Struttura chimica dell'acido aminocaproico

La sua azione d'inibitore della fibrinolisi è molto potente, si usa per la riduzione delle manifestazioni emorragiche, in particolar modo dopo gli interventi. La problematica che può essere riscontrata è la mancata lisi dei trombi formati durante il trattamento. Il farmaco risulta comunque nella maggior parte dei casi sicuro con rari casi di miopatia e necrosi muscolare. Si assorbe rapidamente in seguito a somministrazione orale, viene escreto come tale al 50 % entro 12 ore. Attraverso la via endovenosa ha una prima somministrazione di 4-5 g nell'arco di un'ora e una successiva infusione di 1-1.25 g all'ora fino al controllo dello stato emorragico, non superando i 30 g nelle 24 ore.

L'acido tranexamico, anch'esso analogo della lisina, ha un'azione affine all'acido aminocaproico.

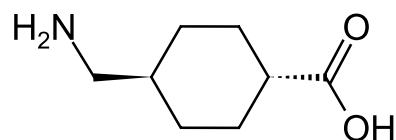


Figura 10. Struttura chimica dell'acido tranexamico

Un ulteriore uso terapeutico, in confronto al precedente farmaco, è l'assunzione per via orale nel trattamento del sanguinamento mestruale eccessivo, somministrato per 4 giorni con un dosaggio di 1 g quattro volte al giorno. ⁽³⁾

4.5 Antiaggreganti piastrinici

L'aggregazione piastrinica oltre ad avere azione fisiologica in caso di lesioni, nella formazione del tappo piastrinico, può agire in maniera patologica causando eventi trombotici dando infarto miocardico, ictus e trombosi vascolari. Per la regolazione di queste manifestazioni sono di particolare importanza gli antiaggreganti piastrinici, questi usati tra di loro anche in associazione risultano aggiuntivi oppure aumentano l'azione.

L'acido acetilsalicilico, comunemente chiamato aspirina, inibisce la produzione di trombossano (TxA_2) acetilando la Ser₅₁₆ nel sito attivo della COX-2 (cicloossigenasi-2) e la Ser₅₃₀ nel sito attivo della COX-1 (cicloossigenasi-1).

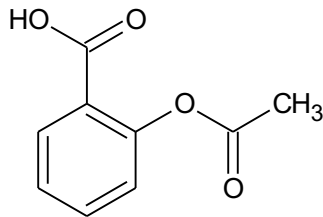


Figura 11. Struttura chimica dell'acido acetilsalicilico

Date le diverse dimensioni delle cicloossigenasi l'azione a riguardo sarà differente, nel caso della COX-2 le grandi dimensioni bloccano in parte l'azione del farmaco, il quale punterà ad agire meglio sulla COX-1. L'aspirina ha un'azione di inibizione irreversibile, restando legata alle cicloossigenasi delle piastrine durante tutta la loro vita di 7-10 giorni, questo perché esse non si rinnovano ma hanno una vita ciclica. La terapia associata al farmaco varia in base all'azione che si vuole ottenere, come antitrombotico ha una massima efficacia a dosi tra 50-320 mg al giorno. Dosaggi più elevati non sono consigliabili, in quanto il farmaco perderebbe l'efficienza della azione antiaggregante per la perdita di produzione di prostaciline e, inoltre, si potrebbe andare in contro ad eventi emorragici.

La ticlopidina profarmaco tienopiridinico con attività inibitoria sul recettore P2Y₁₂, quest'ultimo è un recettore purinergico delle piastrine accoppiato a una G_i.

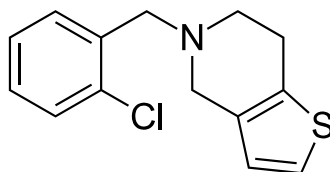


Figura 12. Struttura chimica della ticlopidina

In seguito ad attivazione dall'ADP inibisce adenilato ciclasi riducendo AMP ciclico. È presente un secondo recettore, P2Y₁, attivato dall'ADP induce cambiamento morfologico e aggregazione piastrinica. L'azione del profarmaco consiste in un'inibizione irreversibile di P2Y₁₂ per formazione di un ponte disolfuro tra il suo gruppo tiolico e un residuo di cisteina libero a livello extracellulare del recettore. Il dosaggio consigliato è di 250 mg due volte al giorno ottenendo un effetto farmacologico dopo 8-11 giorni dall'inizio del trattamento e successivamente alla sospensione l'inibizione permane per alcuni giorni. Gli effetti collaterali più comuni dovuti all'utilizzo della ticlopidina sono nausea, vomito e diarrea, seguito da condizioni più gravi come discrasie ematiche potenzialmente fatali che hanno condotto ad un abbandono del farmaco per preferire il clopidogrel.

Il clopidogrel è più potente e con una tossicità ridotta rispetto la ticlopidina, agiscono nello stesso modo andando ad inibire irreversibilmente il recettore P2Y₁₂.

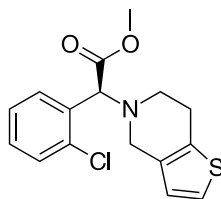


Figura 13. Struttura chimica del clopidogrel

Anch'esso è un profarmaco con lenta insorgenza d'azione, il dosaggio preferibilmente utilizzato è di 75 mg al giorno, con la possibilità o meno di una dose di carico di 300 o

600 mg. A livello terapeutico è consigliabile il suo utilizzo nella riduzione dell'incidenza di ictus, infarto miocardico, ed è reputato leggermente migliore rispetto all'aspirina, in alcuni casi è prevista l'associazione dei due per ottenere un effetto sinergico.

Il prasugrel fa parte delle tienopiridine, profarmaco con azione più rapida rispetto la ticlopidina e il clopidogrel ed una più intuibile inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP. Il farmaco viene assorbito completamente a livello intestinale e risulta quasi completamente attivo. Il confronto con il clopidogrel indica che il prasugrel ha un'inferiore incidenza di morte per cause cardiovascolari, infarto miocardico e ictus, al contrario per rischio emorragico risulta maggiormente influente. L'uso di questo farmaco è preferibile in pazienti con un peso corporeo superiore ai 60 Kg e non in condizioni di insufficienza renale. Si parte con una dose di carico di 60 mg, per poi proseguire con 10 mg al giorno; se in condizioni critiche di peso inferiore ai 60 Kg o età superiore ai 75 anni la dose giornaliera sarà inferiore, 5 mg.

Gli inibitori della glicoproteina IIb/IIIa sono potenti antiplastrinici, delle integrine di superficie denominate anche $\alpha_{IIb}\beta_3$. Fisiologicamente permettono una modifica conformazionale quando le piastrine vengono attivate, così operando come un recettore per il fibrinogeno e il fattore di von Willebrand. Attualmente sono presenti solo alcuni principi attivi che agiscono con queste caratteristiche:

- L'abciximab è un anticorpo monoclonale umanizzato che agisce direttamente inibendo il recettore $\alpha_{IIb}\beta_3$. Se dato in associazione con aspirina ed eparina, si è dimostrato efficace nel prevenire la ristenosi, l'infarto miocardico ricorrente e la morte. L'emivita dell'anticorpo libero è di 30 minuti, se legato all'integrina si prolunga a 18-24 ore dopo infusione; la somministrazione in bolo iniziale è di 0.25 mg/kg, per mantenere un'infusione di 0.125 μ g/Kg per minuto per 12 o più ore. Gli effetti collaterali rispecchiano quelli dei farmaci fibrinolitici ed eventi emorragici; il loro utilizzo rimane controllato dato il loro costo eccessivo.
- L'eptifibatide è un peptide ciclico che lavora inibendo il sito di legame per il fibrinogeno sul recettore $\alpha_{IIb}\beta_3$, blocca l'aggregazione piastrinica. La

somministrazione è parenterale in bolo di 180 µg/Kg con successiva infusione di 2 µg/Kg/min per 96 ore. L'uso terapeutico è nella trattazione della sindrome coronarica acuta e in interventi di angioplastica coronarica; l'effetto terapeutico è ridotto rispetto l'abciximab. L'emorragia risulta l'effetto collaterale più evidente con l'uso di questi farmaci.

Il ticagrelor è un inibitore reversibile del recettore P2Y₁₂ e rientra tra i nuovi antiaggreganti piastrinici.

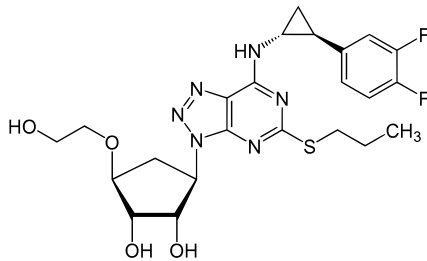


Figura 14. Struttura chimica del ticagrelor

La somministrazione è per via orale due volte al giorno e risulta più efficace del clopidogrel per la rapidità d'azione e per l'inibizione maggiore e la prevedibilità dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP. Il farmaco è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) nell'uso per la prevenzione di eventi trombotici. È stata dimostrata una riduzione dei casi di morte per cause cardiovascolari in pazienti con sindrome coronarica acuta. ⁽³⁾

SCOPO DELLO STUDIO

Gli scopi dello studio svolto sono i seguenti:

1. La validazione di un pannello genetico di sequenziamento con tecnologia NGS in pazienti affetti da METC.
2. L'analisi in silico delle varianti genetiche identificate al fine di predirne il ruolo biologico e la relazione con il trattamento farmacologico.

MATERIALI E METODI

1. Pazienti

Questo è uno studio retrospettivo che è stato condotto in 103 pazienti (48 maschi e 55 femmine, età media 58 ± 4) affetti da METC diagnosticati dal Centro delle Malattie Trombotiche ed Emorragiche dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova. Per ogni partecipante è stato raccolto un campione di sangue venoso per l'estrazione del DNA. I pazienti hanno firmato il consenso informato per lo studio genetico.

2. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA viene eseguita utilizzando il kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* da un prelievo di sangue raccolto in provette con EDTA. Il campione di sangue viene centrifugato a 2500 giri per 15 minuti, per separare il buffy coat ricco di globuli bianchi dal plasma.

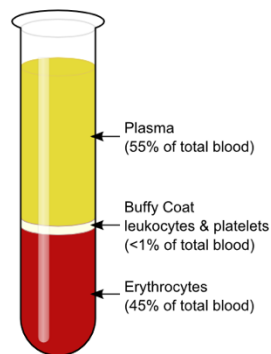


Figura 15. Separazione buffy coat dal plasma

Brevemente, al campione di sangue viene aggiunto l'enzima proteinasi K che denatura le proteine, una soluzione tampone di PBS (tampone fosfato) e una soluzione di lisi cellulare per 10 minuti a 56°C . La fase di purificazione consiste nel caricamento dell'estratto di DNA nelle colonnine cromatografiche (*DNeasy Mini spin column*) che legano in modo specifico solo il DNA. Vengono poi eseguiti due lavaggi con buffer contenenti etanolo. Il DNA viene eluito con una soluzione di eluizione e viene conservato a -20°C per i successivi studi.

3. Controllo quantitativo e qualitativo del DNA purificato

La definizione della concentrazione e della qualità di DNA purificato viene stabilito mediante lettura spettrofotometrica al *Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)*.

Lo spettrofotometro è composto da una sorgente che emette radiazioni nel campo dell'UV-Visibile: questo dispositivo riesce a selezionare le radiazioni ad una specifica lunghezza d'onda passando prima attraverso un monocromatore. La radiazione passa attraverso il campione e viene assorbita dall'acido nucleico. L'analisi spettrofotometrica segue il principio della legge di Lambert-Beer, secondo la quale l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie assorbente contenuta nel campione analizzato, valutando anche il coefficiente di assorbimento e il cammino ottico. La concentrazione di DNA viene misurata alla lunghezza d'onda di 260 nm in ng/μl e la purezza del DNA dal rapporto delle assorbanze alle lunghezze d'onda 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) che deve essere nel range tra 1.7 e 2.

4. Analisi genetica mediante tecnologia NGS

L'analisi delle mutazioni coinvolte nella cascata coagulativa e nel rischio emorragico e trombotico viene eseguita mediante tecnologia *Next Generation Sequencing (NGS)*.

Questa metodologia è strutturata in tre fasi:

- preparazione delle librerie;
- arricchimento e cattura dei frammenti di interesse;
- sequenziamento NGS.

Tutte queste fasi prevedono dei controlli di quantità e di qualità che assicurano l'accurata analisi delle varianti o mutazioni.

5. Preparazione delle librerie

La preparazione delle librerie di DNA viene eseguita mediante il kit *xGen DNA library Prep EZ (IDT-Tema Ricerca)*, prevede una fase iniziale di frammentazione, una fase di ligazione degli adattatori e una fase finale di pre-amplificazione delle librerie.

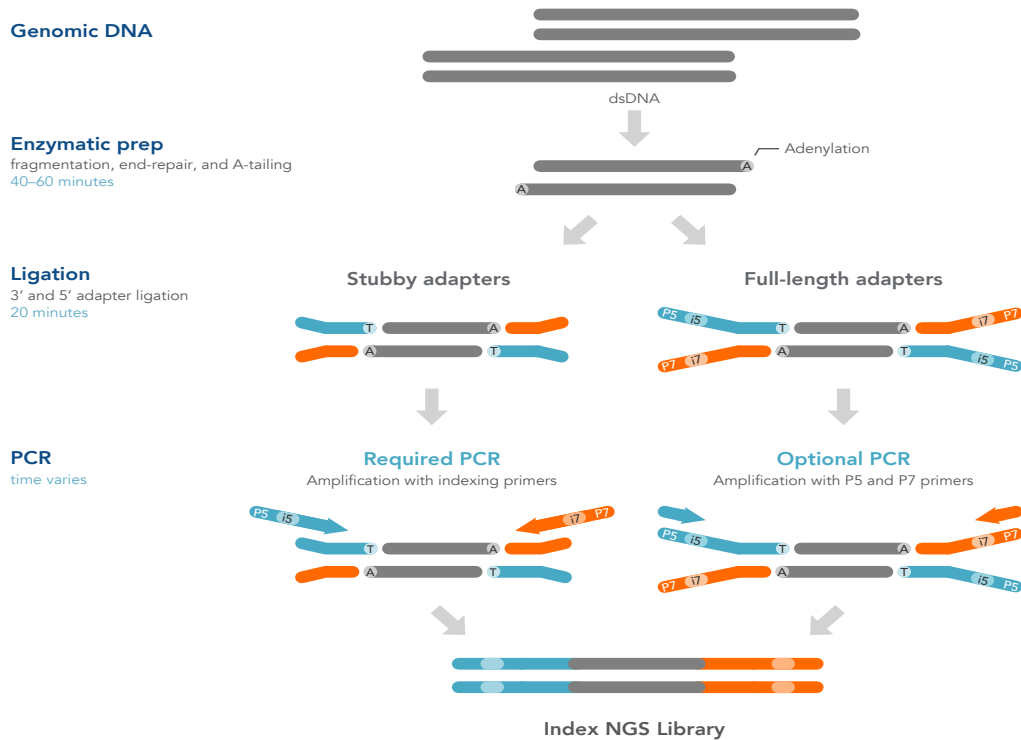


Figura 16. Preparazione librerie

5.1 Preparazione dei campioni

Le librerie sono state preparate utilizzando 100 ng di DNA. La frammentazione del DNA è stata effettuata incubando il campione con enzimi di restrizione ed endonucleasi allo scopo di ottenere dei frammenti di lunghezza variabile tra 200-400 nucleotidi.

5.2 Ligazione degli adattatori

La reazione di ligazione ha lo scopo di unire i frammenti di DNA alle estremità 3' e 5' con gli adattatori che sono sequenze nucleotidiche complementari agli adattatori presenti sulla flow cell del sequenziatore. La reazione di ligazione utilizza l'enzima ligasi e gli *stubby adapters*, avviene a 20°C per 20 min in un termociclatore.

5.3 Cleanup post ligazione

Successivamente alla fase di ligazione viene effettuato un *cleanup*, che ha lo scopo di trattenere i frammenti di DNA legati agli adattatori e di eliminare i reattivi in eccesso. La purificazione del prodotto di ligazione avviene utilizzando le biglie magnetiche *Agencourt® AMPure® XP-PCR purification beads (Beckman Coulter)*, progettate in modo tale da trattenere selettivamente il prodotto di ligazione e lasciare liberi in soluzione i reattivi in eccesso, così che possano essere prelevati ed eliminati.

5.4 Amplificazione mediante PCR

La PCR (polymerase chain reaction) consiste in un insieme di reazioni a catena della polimerasi che permettono l'amplificazione dei frammenti iniziali. Una prima fase di denaturazione di DNA, una fase di appaiamento dei primers specifici ed infine l'estensione con amplificazione delle sequenze di interesse. Questa fase consiste in una pre-amplificazione del prodotto di ligazione mediante *PCR Master Mix*, primer specifici e *index*. Gli *index* sono brevi sequenze nucleotidiche (10 basi) che lavorano come *barcode* del campione e permetteranno di identificarlo durante l'analisi bioinformatica che segue il sequenziamento.

5.5 Cleanup post PCR

Al termine della reazione di pre-amplificazione si ottengono le librerie. Si esegue pertanto un *cleanup* per purificare la libreria mediante le biglie magnetiche *Agencourt® AMPure® XP-PCR purification beads (Beckman Coulter)*, con una

procedura analoga al *cleanup post-ligazione*. Al termine della procedura di *cleanup*, in ciascun pozzetto vengono aggiunti 21 μL di buffer di eluizione, che provocherà il distacco delle librerie dalle biglie magnetiche e il loro passaggio in soluzione. La piastra viene disposta per un'ultima volta sul supporto magnetico, dove le biglie vengono attratte e trattenute dal supporto stesso, mentre il surnatante limpido (contenente le librerie di DNA) viene prelevato e trasferito in una provetta. Il volume finale ottenuto per ciascuna libreria è di 20 μL .

5.6 Quantificazione delle librerie

La determinazione della concentrazione delle librerie espressa in $\text{ng}/\mu\text{L}$ viene eseguita mediante il fluorimetro *Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific)*. Il Qubit è un fluorimetro che permette la misurazione della concentrazione dei campioni in $\text{ng}/\mu\text{L}$ utilizzando degli standard fluorescenti.

5.7 Controllo della qualità e delle dimensioni delle librerie

Il controllo di qualità delle librerie è stato effettuato utilizzando lo strumento *LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (PerkinElmer)*, che separa i frammenti contenuti nel campione in base alla loro dimensione, sfruttando il principio dell'elettroforesi capillare. Come mostrato in Figura 17, la lunghezza media delle librerie è di 250-350 bp. Il chip utilizzato per l'analisi qualitativa delle librerie è il *HS DNA (High Sensitivity)*.

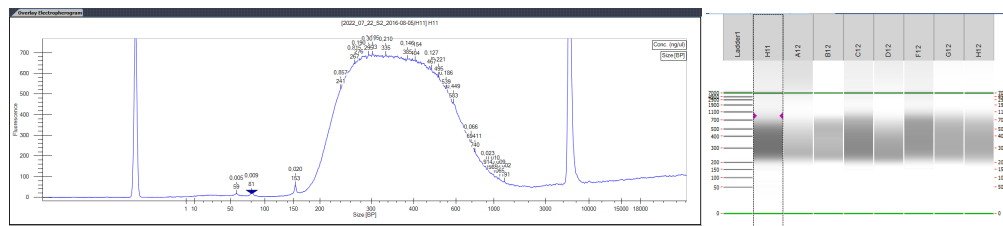


Figura 17. Controllo di qualità delle librerie, lunghezza dei frammenti

Nella fase di preparazione è necessario lasciar equilibrare a temperatura ambiente il chip e i reagenti per almeno 30 minuti prima di iniziare. Il primo step consiste nella preparazione del Gel-Dye Solution, si preparano 550 μL di DNA Gel Matrix e si

aggiungono 6.5 µl di DNA Dye. Nel frattempo, si procede alla preparazione dei campioni e si utilizzerà una piastra specifica per lo strumento. Il risultato dell'elettroforesi capillare è dato da un elettroferogramma con le dimensioni dei frammenti di DNA che sono stati precedentemente ottenuti.

Questa analisi qualitativa consente di determinare la lunghezza media dei frammenti ottenuti nelle librerie e di ricalcolare la concentrazione in nM per il caricamento sul sequenziatore.

Dopo la quantificazione, le librerie vengono conservate a -20°C fino al momento di procedere con arricchimento e cattura dei frammenti di interesse (enrichment step).

6. Arricchimento e cattura dei frammenti di DNA

La seconda fase consiste nell'arricchimento e nella cattura delle librerie di DNA di interesse dove verrà eseguita l'analisi genetica. Per questo scopo, viene utilizzato un pannello genetico di 33 geni della cascata coagulativa, come mostrato nella tabella 1.

GENE	PROTEINA
<i>A2M</i>	<i>alfa-2 macroglobulin</i>
<i>CPB2 (1361)</i>	<i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>
<i>F10 (2159)</i>	<i>coagulation factor X</i>
<i>F11 (2160)</i>	<i>coagulation factor XI</i>
<i>F12 (2161)</i>	<i>coagulation factor XII</i>
<i>F13A1 (2162)</i>	<i>coagulation factor XIII A chain</i>
<i>F13B (2165)</i>	<i>coagulation factor XIII B chain</i>
<i>F2 (2147)</i>	<i>coagulation factor II, thrombin</i>
<i>F3 (2152)</i>	<i>coagulation factor III, tissue factor</i>
<i>F5 (2153)</i>	<i>coagulation factor V</i>
<i>F7 (2155)</i>	<i>coagulation factor VII</i>
<i>F8 (2157)</i>	<i>coagulation factor VIII</i>

<i>F9 (2158)</i>	<i>Coagulation Factor IX</i>
<i>FGA (2243)</i>	<i>fibrinogen alpha chain</i>
<i>FGB (2244)</i>	<i>fibrinogen beta chain</i>
<i>FGG (2266)</i>	<i>Fibrinogen Gamma Chain</i>
<i>KLKB1 (3818)</i>	<i>Kallikrein B1</i>
<i>KNG1 (3827)</i>	<i>Kininogen 1</i>
<i>PLAT (5327)</i>	<i>Tissue plasminogen activator</i>
<i>PLG (5340)</i>	<i>Plasminogen</i>
<i>PROC (5624)</i>	<i>Protein C, inactivator of coagulation factors Va and VIIIa</i>
<i>PROCR</i>	<i>Endothelial protein C receptor</i>
<i>PROS1 (5627)</i>	<i>Protein S</i>
<i>PROZ</i>	<i>protena zeta</i>
<i>SERPINA10</i>	<i>proteina zeta inhibitor</i>
<i>SERPINA5 (5104)</i>	<i>protein C inhibitor</i>
<i>SERPINC1 (462)</i>	<i>Antithrombin-III</i>
<i>SERPIND1 (3053)</i>	<i>heparin cofactor II</i>
<i>SERPINE1 (5054)</i>	<i>Endothelial Plasminogen Activator Inhibitor</i>
<i>SERPINF2 (5345)</i>	<i>alfa 2 antiplasmina</i>
<i>TFPI (7035)</i>	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
<i>THBD (7056)</i>	<i>thrombomoduline</i>
<i>VWF (7450)</i>	<i>Von Willebrand Factor</i>

Tabella 1. Pannello genico specifico

Questo pannello è costituito da 861 sonde biotinilate di lunghezza di 120 nucleotidi specifiche per tutti gli esoni (parte codificante del gene) dei 33 geni di interesse. Queste sonde biotinilate di interesse verranno ibridizzate insieme alle librerie e poi “catturate” con delle biglie magnetiche legate alla streptavidina.

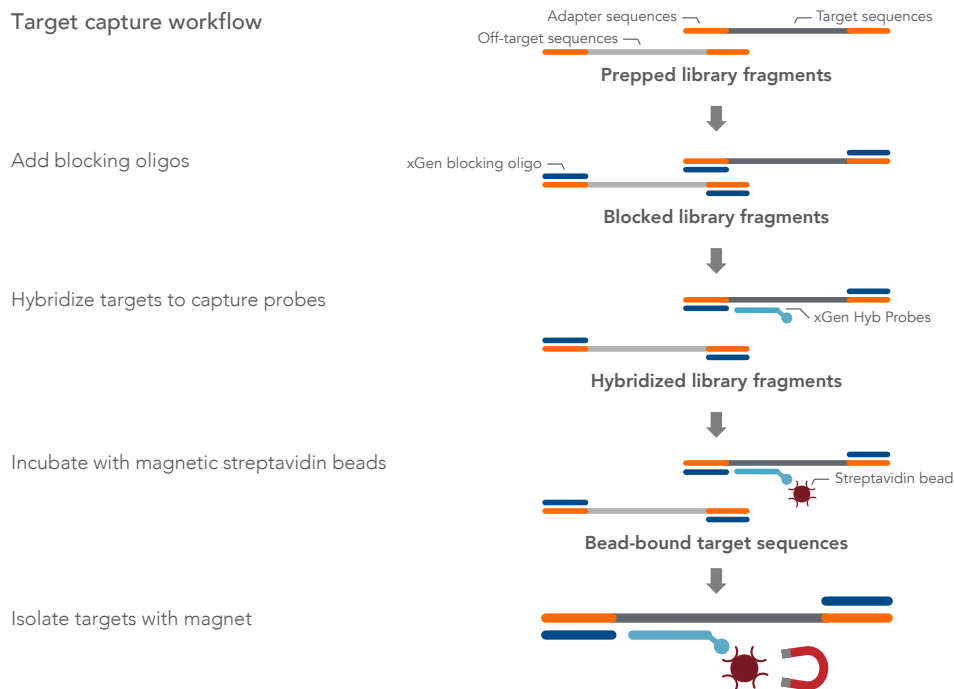


Figura 18. Ibridazione pool librerie

6.1 Costruzione di un pool di librerie

8-12 librerie in egual concentrazione (500 ng) vengono riunite per creare un pool su cui effettuare l'ibridazione con le probe studiate per il pannello target (tabella 1). Il pool viene fatto reagire con una soluzione contenente *xGen Universal Blockers* e *xGen Human Cot DNA*.

I *Blockers* vengono utilizzati per ridurre l'interazione non specifica dell'adattatore durante l'ibridazione e aumentano le prestazioni di acquisizione sul target e *Human Cot DNA* per bloccare il legame non specifico nelle reazioni di ibridazione del DNA; il DNA utilizzato è di tipo placentare arricchito con sequenze di DNA ripetitive.

In seguito, il tutto viene posto all'interno del sistema SpeedVac un sistema a vuoto in cui si fa evaporare il campione grazie anche alla temperatura di 60°C per circa 4 ore (dipende dal volume della provetta). Successivamente l'essiccato viene lasciato a temperatura ambiente per tutta la notte se usato il giorno seguente, in alternativa viene posto a -20°C per tempi più lunghi.

6.2 Reazione di ibridazione

Il pool di librerie viene fatto ibridare con le sonde oligonucleotidiche biotinilate specifiche per i geni target selezionati a 65°C per 4h in una reazione contenente *xGen Hybridization Buffer* e *xGen Hybridization Buffer enhancer*.

Durante la fase di ibridazione vengono preparati i buffer dei lavaggi successivi, questi andranno a rimuovere le librerie non di interesse. Inoltre, è richiesta la preparazione della *Bead Resuspension Mix*, servirà per risospendere le biglie di streptavidina al termine dello step successivo.

6.3 Lavaggio delle biglie di streptavidina

Prima di procedere con il lavaggio delle biglie di streptavidina (*Dynabeads® M-270 Streptavidin beads*) è necessario assicurarsi che siano state riequilibrare a temperatura ambiente e che siano state accuratamente risospese utilizzando un vortex. Le biglie sono delle *streptavidin beads*, la streptavidina è una proteina isolata dal batterio *Streptomyces avidinii*, possiede 4 legami che vanno a legarsi alla biotina, vitamina idrosolubile che si trova libera e legata alle proteine. L'uso delle biglie di streptavidina permette un legame specifico per le catene dei frammenti di DNA ibridati che presentano biotina. La preparazione delle biglie consiste nel porre in provetta 50 µl di *streptavidin beads* e 100 µl di *beads wash buffer*, si pone sul magnete aspettando 1 minuto e per poi eliminare il surnatante, questo lavaggio viene ripetuto 2 volte e poi infine si risospendono le biglie con i 17 µl di *Beads Resuspension MIX*.

6.4 Reazione di cattura

Le librerie ibridate con le sonde specifiche biotinilate vengono catturate con le biglie magnetiche legate alla streptavidina. Questo step permette di selezionare solamente le librerie di interesse, che si sono ibridizzate alle sonde.

6.5 Lavaggi con i buffers

Lo step di cattura è seguito da una serie di lavaggi, suddivisi in lavaggi “a caldo”, così chiamati perché i buffers utilizzati durante questa fase sono riscaldati a 65°C, e in lavaggi a temperatura ambiente. Al termine dei lavaggi, il pool di librerie catturato viene risospeso in 20µL di *nuclease-free water* ed è pronto per lo step successivo.

6.6 PCR post cattura

Lo step di amplificazione serve per aumentare il numero di copie delle librerie selezionate durante lo step di cattura e viene realizzato mediante la reazione di una PCR di 11 cicli di amplificazione contenente *Kapa HiFi Master Mix* e i primers per l'amplificazione della libreria. Al termine della reazione di PCR si procede con il cleanup mediante l'uso delle biglie *Agenocourt AMPure XP beads*.

6.7 Purificazione del prodotto di amplificazione

L'ultimo step del *workflow* ha lo scopo di purificare le librerie di DNA che sono state selezionate mediante cattura e successivamente amplificate mediante PCR. Questo step di purificazione viene realizzato utilizzando le biglie magnetiche *Agencourt® AMPure® XP purification beads (Beckman Coulter)*. Dopo una serie di lavaggi, il pool di librerie amplificato legato alle biglie viene eluito in 22µL di buffer Low EDTA TE. Al termine di un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, le biglie vengono catturate dal magnete e 20µL di eluato (limpido e privo di biglie) vengono posti a -20°C per essere utilizzati per il sequenziamento NGS.

6.8 Quantificazione del pool di librerie

Al termine del processo di *enrichment*, il pool di librerie amplificate e purificate viene quantificato utilizzando lo strumento *Qubit 4 Fluorometer*, come precedentemente descritto.

7. Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS)

Per il sequenziamento NGS delle librerie di DNA ottenute mediante *enrichment*, nell'ambito di questo studio è stato utilizzato lo strumento NextSeq 550 (Illumina). I pool di librerie alla concentrazione di 4 nM vengono riuniti in un'unica soluzione che verrà ulteriormente diluita alla concentrazione di 2 nM per essere denaturata con NaOH 0.2 N. Dopo 5 minuti, la reazione viene fermata aggiungendo una soluzione di HT1 (*hybridization buffer*). Dopo opportune diluizioni, la concentrazione finale del pool di librerie sarà di 1.5 pM, a cui viene aggiunto il 2% di Phix in un volume finale di 1.3 ml. Il genoma di questo batteriofago viene utilizzato come controllo di qualità per la possibile generazione di errori da parte dello strumento. La flow cell utilizzata è *Mid Output kit v2.5 (300 cycles, Illumina)*.

7.1 Preparazione pool finale

La fase di preparazione consiste nel denaturare il pool portandolo alla concentrazione desiderata per il caricamento, oltre a questo si preparerà il Phix necessario durante il sequenziamento.

Il primo passaggio è quello di andare a denaturare il pool con NaOH 0.2 N, si utilizzano 10 µl del pool finale (2 nM) e 10 µl di NaOH, si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente, per bloccare la reazione in atto si aggiungono 10 µl, lo stesso volume, di Tris-HCl 0.2 M pH=7. Il volume totale risultante è di 30 µl, a questo si aggiungerà HT1 freddo, un tampone di ibridazione, per portare la libreria ad una concentrazione di 20 pM e per un volume totale di 1 ml che si centrifugherà. Si porta adesso alla

concentrazione finale di 1.5 pM con l'uso di HT1 freddo per un volume totale di 1.3 ml e si andrà a centrifugare, per poi lasciare in ghiaccio.

La concentrazione finale del pool da caricare nello strumento non deve essere troppo elevata per evitare di avere un "overclustering", in cui lo strumento non è in grado di interpretare le letture per l'abbondanza di librerie, o troppo bassa per evitare di incorrere in un "underclustering", dove vengono identificate solamente poche librerie geniche.

7.2 Caricamento su NGS

Lo strumento NextSeq 550 è un sistema di sequenziamento di seconda generazione che si basa sul metodo *sequencing by synthesis (SBS)*. In questo sistema i frammenti della libreria di DNA vengono denaturati a filamenti singoli. Questi filamenti vengono poi caricati nella cella a flusso (*flowcell*), dove ha luogo la reazione di amplificazione a ponte (*bridge amplification*) che porta alla formazione di gruppi (*clusters*) di frammenti clonali di DNA. Si procede poi alla fase di linearizzazione. A questo punto viene aggiunta la miscela con i quattro ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP), caratterizzati da un terminatore di catena e legati a probe fluorescenti. Ogni volta che un ddNTP complementare al filamento da copiare viene incorporato nella catena in crescita, il gruppo terminatore viene rimosso, la probe fluorescente emette il segnale di emissione che verrà captata da un CCD (*charge-coupled device*) e convertito nella base corrispondente.

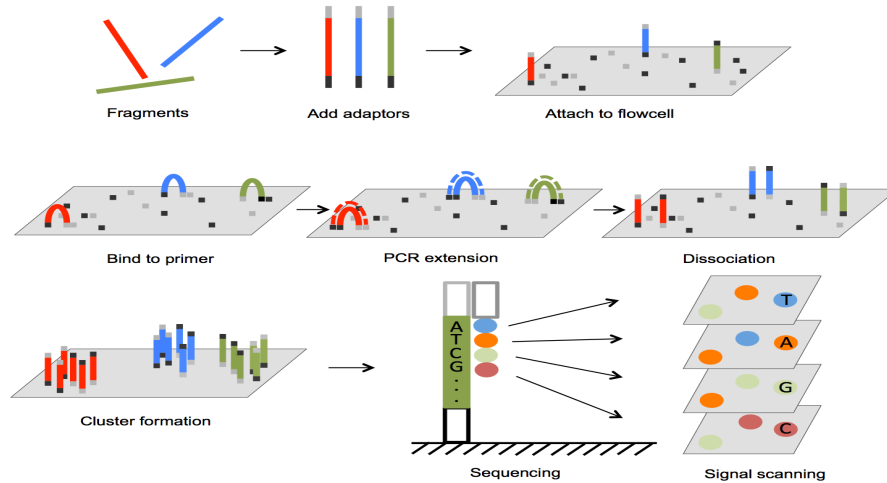


Figura 19. Analisi genica dello strumento Next Generation Sequencing (Illumina)

7.3 Controllo della qualità della corsa NGS

Il controllo di qualità della corsa NGS è stato eseguito utilizzando il software *Sequencing Analysis Viewer* (Illumina). I parametri considerati sono stati il bilanciamento delle basi, il *Q-score* e la *cluster density*.

- Per bilanciamento delle basi si intende il raggiungimento di un equilibrio tra le basi lette dallo strumento durante ogni ciclo di sequenziamento.
- Il *Q-score* è un valore che indica l'accuratezza di chiamata delle basi durante la corsa di sequenziamento. NGS utilizza il punteggio Q30, ciò significa che l'accuratezza di chiamata di ciascuna base è superiore al 99,9% e la probabilità che si verifichi un errore di lettura è di 1 base su 1000.
- La *cluster density* è il numero di kilobasi individuate in un mm^2 di superficie della *flow cell* e viene misurato come K/mm^2 . La *cluster density* viene rappresentata con un *box plot* che riporta la *cluster density* ottimale, il range di variabilità accettabile e la *cluster density* ottenuta durante la corsa. Ciascuna *flow cell* possiede infatti un range di densità caratteristico, che deve essere rigorosamente rispettato per evitare di incorrere nell'*underclustering* o nell'*overclustering*.

7.4 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti al termine del sequenziamento è stata effettuata utilizzando il software bioinformatico CLC Genomics, sviluppato da Qiagen.

Lo strumento NextSeq restituisce come *output* del processo di sequenziamento un file Fast Q per ciascun campione inserito nel *pool*, identificato attraverso l'*index* specifico. Un file Fast Q è un file di testo che contiene informazioni relative al modello di sequenziatore utilizzato, alle caratteristiche della flow cell, alle metriche del controllo di qualità della corsa e alle sequenze nucleotidiche ottenute.

Per prima cosa i file Fast Q generati dal sequenziatore vengono caricati su un software come *Sequencing Analysis Viewer* (Illumina) per verificare i parametri di qualità della corsa, ovvero il *QScore*, la *cluster density* e il bilanciamento delle basi, ma anche il numero di reads e la coverage. In un secondo momento, solo dopo aver verificato che la corsa di sequenziamento soddisfi i parametri di qualità richiesti, i file Fast Q vengono caricati sui software bioinformatici specifici per l'analisi delle sequenze nucleotidiche e l'identificazione di eventuali mutazioni.

Indipendentemente dal software utilizzato, il primo step per l'analisi delle sequenze nucleotidiche è rappresentato dal *trimming*, ovvero l'eliminazione virtuale degli adattatori. In seguito al *trimming*, il *workflow* del software bioinformatico procede con l'allineamento delle *reads* ottenute al genoma di riferimento; questo processo permette di identificare eventuali differenze tra il genoma di riferimento e il DNA del paziente. Ciascuna variazione riscontrata rispetto al genoma di riferimento deve essere attentamente valutata, per comprendere se si tratta di un'alterazione realmente presente nel genoma del paziente oppure se si tratta di un errore introdotto durante il sequenziamento.

Successivamente all'identificazione delle mutazioni presenti in ciascun campione è stato indagato il significato patologico di ciascuna alterazione utilizzando alcuni *tools* bioinformatici disponibili online come dbSNP, ClinVar e PolyPhen-2.

7.5 Validazione mediante sequenziamento Sanger

Alcune mutazioni identificate mediante sequenziamento Next Generation Sequencing sono state validate utilizzando il metodo Sanger eseguito sullo strumento Applied Biosystem.

RISULTATI

1. Validazione del pannello di 33 geni per l'analisi genica in pazienti affetti da METC

Sono state eseguite 2 corse NGS caricando in ciascuna un *pool* di librerie costituito da 50 e 53, rispettivamente, campioni di DNA dei pazienti affetti da METC per la ricerca di mutazioni germinali. Il controllo di qualità delle corse NGS è stato eseguito utilizzando il software *Sequencing Analysis Viewer* (Illumina). I principali parametri considerati per il controllo di qualità della corsa NGS sono stati il *Q-score* e la *cluster density*, come descritto nel capitolo di materiali e metodi.

1.1 Q-score

Durante il sequenziamento NGS è stato ottenuto un punteggio Q30 medio pari a 91.7%, come riportato in Figura 20.

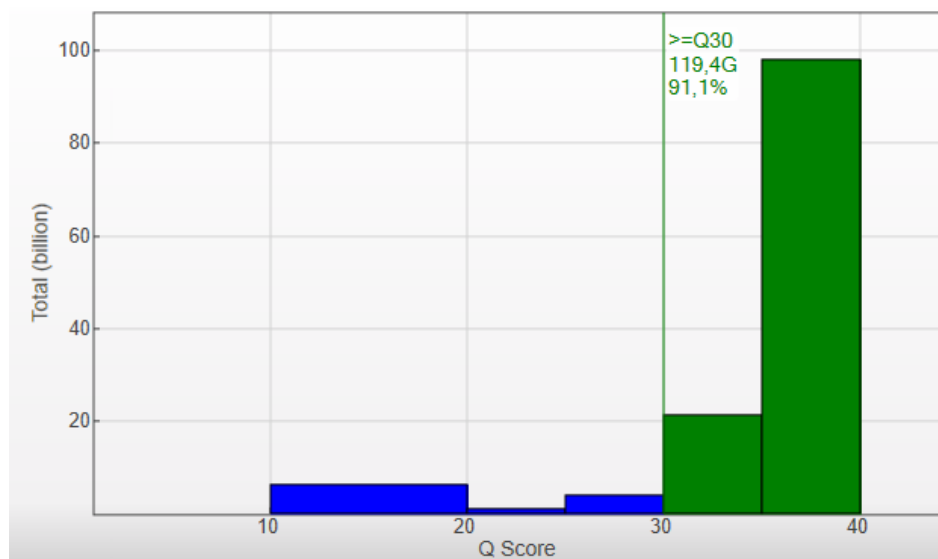


Figura 20. Rappresentazione grafica del numero di basi che hanno superato il filtro di qualità con punteggio Q-score superiore a 30

1.2 Cluster density

La *cluster density* media delle 2 corse NGS è stata di 1285 K/mm², dato che è vicino alla *cluster density* media delle sequenze che hanno superato il filtro e alla *cluster density* teorica specifica per la *flow cell* utilizzata (NextSeq Seq Reagent MidOutput v2.5, 300 cycles, Illumina; 180 K/mm²).

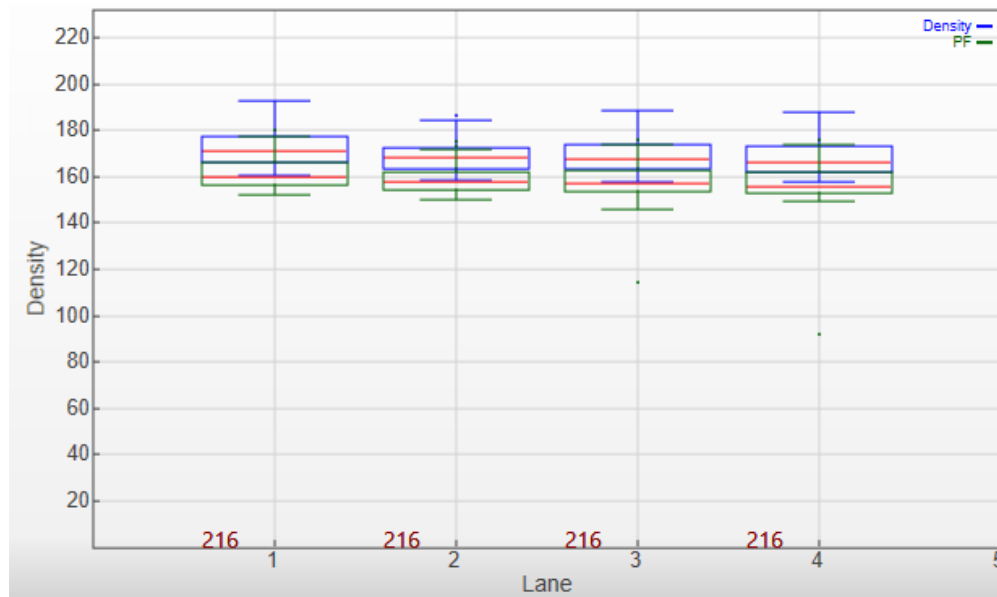


Figura 21. Box plots raffiguranti la cluster density media ottenuta durante il sequenziamento in relazione alla densità ottimale della corsa (box plot blu) e la cluster density media relativa alle sequenze che hanno superato il filtro (box plot verde)

2. Analisi bioinformatica

I files FastQ restituiti dallo strumento NextSeq 550 al termine della corsa di sequenziamento sono stati analizzati mediante il software bioinformatici: CLC Genomics (Qiagen) che utilizza uno specifico algoritmo per chiamare le varianti genetiche. Lo schema generale e semplificato per l'analisi bioinformatica delle varianti viene riportato in Figura 22.

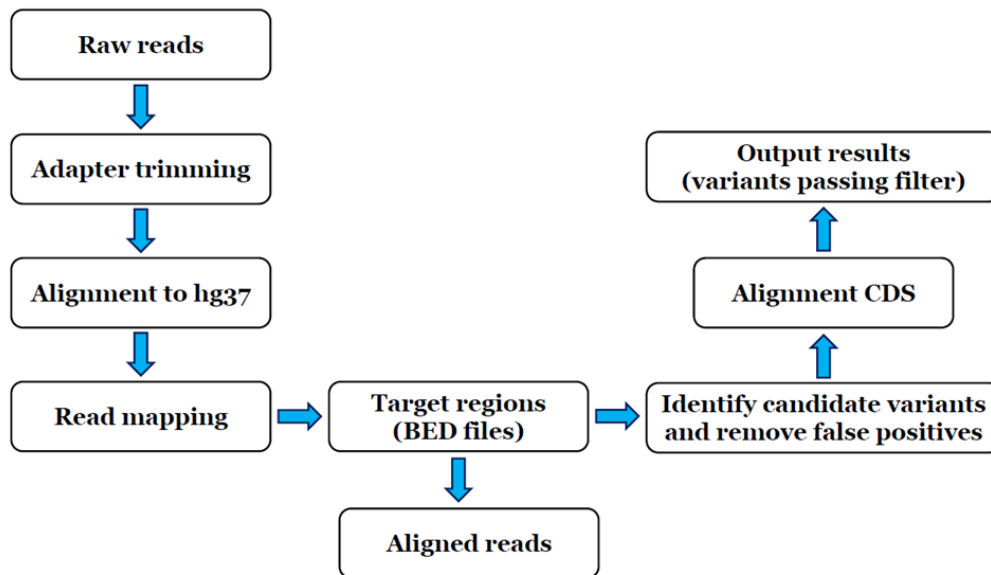


Figura 22. Rappresentazione schematica del workflow utilizzato dai softwares bioinformatici per l'analisi delle sequenze di DNA

3. Coverage

Nell'ambito di una corsa NGS, per *coverage* si intende la copertura delle regioni target, ovvero il numero medio di volte in cui viene letta una determinata sequenza. All'aumentare del valore di *coverage* aumenta l'affidabilità nell'identificazione delle varianti geniche, perché significa che la regione è stata letta un numero di volte sufficiente per discriminare una variante genica da un errore di sequenziamento.

Se invece il valore di *coverage* è inferiore rispetto al *cut-off* selezionato, il livello di copertura della regione risulta insufficiente per l'identificazione di eventuali varianti geniche.

Numero regioni target		422
Lunghezza totale delle regioni target		78.664
Coverage (x)		%
	1	99,88
	10	99,71
	50	99,59
	100	99,49
	500	97,07
	1.000	80,13

Figura 23. Tabella riassuntiva relativa ai dati di coverage di una corsa NGS, contenuta nel report generato dal software CLC Genomics (Qiagen)

Complessivamente, più del 97% delle basi contenute nelle regioni target sono state coperte o lette almeno 500 volte.

4. Analisi delle mutazioni germinali

Nella seconda parte dello studio sono state identificate le varianti genetiche germinali mediante l'analisi bioinformatica ottenuta dal sequenziamento NGS. I risultati riscontrati riportano la presenza di almeno una mutazione di incerto significato (uncertain significance, VUS) o patologica in 75 pazienti affetti da METC (72.82%), dove 49 pazienti presentano una sola variante genetica, 24 pazienti presentano due varianti genetiche e 2 pazienti presentano tre varianti genetiche, come riportato in Figura 24.

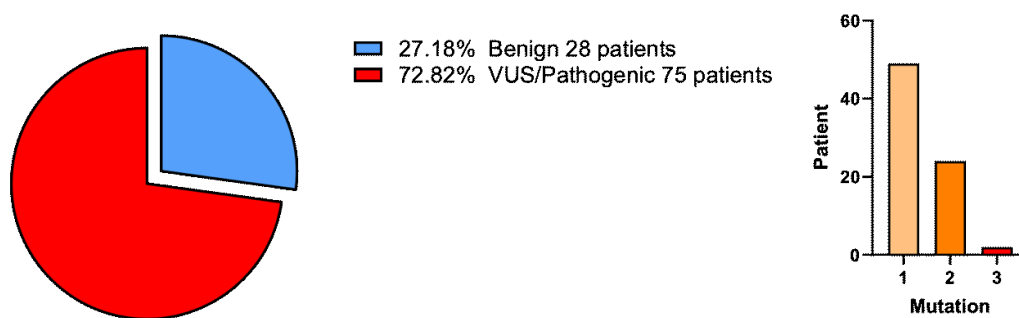


Figura 24. (a) Grafico a torta raffigurante sul totale di 103 pazienti la presenza di varianti benigne e patologiche. (b) Grafico a istogramma con suddivisione in base al numero di varianti per paziente (1 in 49 pazienti, 2 in 24 pazienti, 3 in 2 pazienti)

Abbiamo considerato solo le varianti genetiche che vengono classificate come “VUS”, “probabili patologiche” o “patologiche” in accordo alle linee guida dell’*American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* (4). Le mutazioni VUS sono mutazioni genetiche dal significato incerto, le quali, in silico, possono prevedere un aumentato rischio di malattia ma non vi sono ancora dati di laboratorio sufficienti o epidemiologici di popolazioni che confermino il loro ruolo patogenico. Oltre alle mutazioni VUS e quelle considerate patologiche, in questa coorte di pazienti sono state identificate nuove mutazioni non riportate in letteratura o nel database dei polimorfismi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) in cui significato biologico e fisiopatologico deve essere ancora indagato.

Gene name	Chromosome	Type	Zygoty	Frequency	Amino acid change
<i>F11</i>	4	SNV	Heterozygous	46,91	p.Glu289Gly
<i>F5</i>	1	SNV	Heterozygous	52,75	p.Ser1721Leu
<i>F2</i>	11	SNV	Heterozygous	48,80	p.Glu435Lys
<i>VWF</i>	12	SNV	Heterozygous	49,63	p.Leu1690Arg
<i>PLG</i>	6	SNV	Heterozygous	46,17	p.Val497Ile
<i>PLAT</i>	8	SNV	Heterozygous	48,39	p.Leu287Pro
<i>F13B</i>	1	Deletion	Heterozygous	48,78	p.Ile612fs
<i>PLG</i>	6	SNV	Heterozygous	49,85	p.Lys348Arg
<i>A2M</i>	12	Deletion	Heterozygous	50,28	p.Glu878fs
<i>F5</i>	1	SNV	Heterozygous	46,44	p.Asn1580Ser
<i>PLG</i>	6	SNV	Heterozygous	46,70	p.Tyr283Ser

Tabella 2. Varianti nuove, non ancora studiate e riportate in letteratura

La distribuzione delle varianti identificate come VUS, probabili patologiche o patologiche dei principali fattori della coagulazione sono riportate nella figura 25.

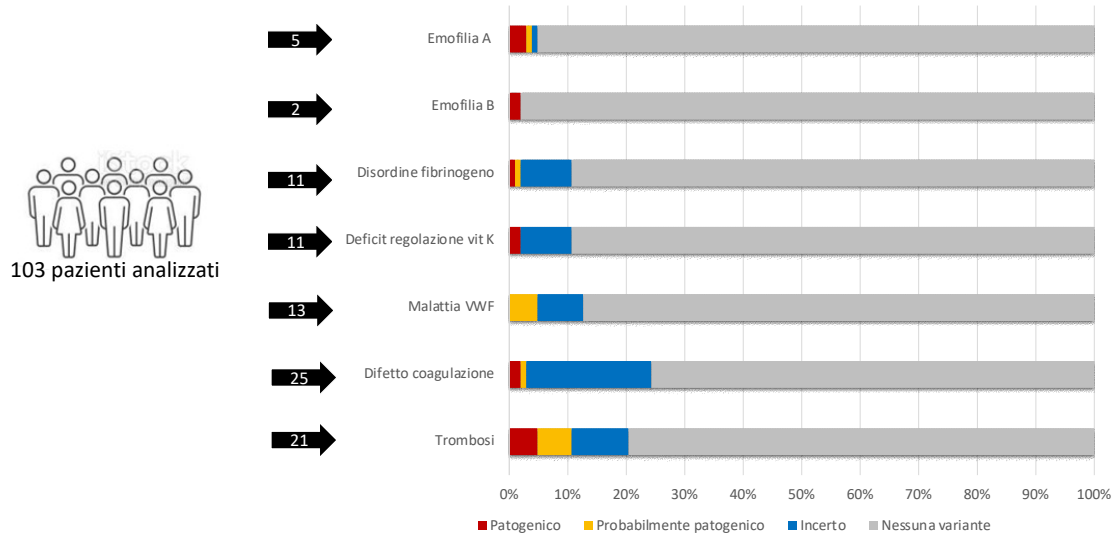


Figura 25. Grafico a istogramma orizzontale raffigurante la presenza di varianti in percentuale nei 103 pazienti

La figura 26 riporta la distribuzione delle varianti genetiche in relazione ai disordini emorragici congeniti come emofilia A, emofilia B, malattia di Von Willebrand o altri disturbi della coagulazione (deficit dei fattori della coagulazione), del fibrinogeno, o deficit combinato dei fattori vit. K-dipendenti, disordini trombotici (protrombina) o di fibrinolisi.

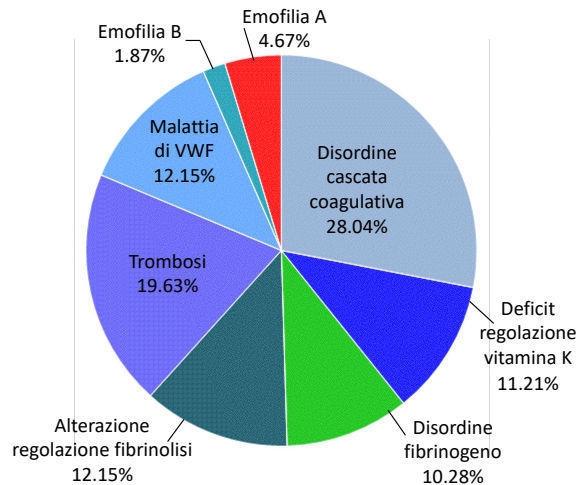


Figura 26. Grafico a torta delle varianti suddivise per patologia

In particolare, l'emofilia A (4.7%) è caratterizzata soprattutto dalla presenza delle varianti del gene che codifica il *fattore VIII*, l'emofilia B (1,9%) dalle varianti del gene del *fattore IX*, entrambi sono ereditati dal cromosoma X. La malattia di von Willebrand, una patologia rara ed ereditaria, causata da un difetto genetico del *fattore di von Willebrand (VWF)* è rappresentata circa dal 12% dei pazienti nella nostra coorte di studio. Il disordine del fibrinogeno dovuto a mutazioni genetiche può essere caratterizzato da un'iperproduzione (iperfibrinogenemia) o riduzione patologica (ipofibrinogenemia) della proteina, questa risulta rappresentata dal 10.3% dei pazienti nella nostra coorte. Il deficit della regolazione della vitamina K, causato da varianti genetiche del gene *PROS1* (*proteina S*) e *PROZ* (*proteina Z*) che codificano proteine vitamina-K dipendenti, è presente nel 11.2% dei pazienti. Le alterazioni della cascata coagulativa che comprendono i geni che codificano per i vari fattori della coagulazione e quelli che regolano la coagulazione, come la *SERPINC1* (*antitrombina III*), il *KNG1*

(*chitinogeno 1*), il *TFPI* (*inibitore della via del fattore tissutale*), l'*A2M* (*alfa-2-macroglobulina*), sono i più rappresentativi (28%) nella nostra coorte. Infine, le varianti genetiche coinvolte dalla trombosi come *F2* (*protrombina*), *SERPINA5* (*inibitore della proteina C*), *SERPINA10* (*inibitore della proteina Z*) coprono circa 20% della nostra coorte.

Vengono rappresentate alcune analisi ottenute dal sequenziamento NGS e validate dal sequenziamento Sanger sul DNA estratto da buffy coat dei pazienti affetti da METC.

La figura 27 mostra l'output ottenuto da IGV (Integrative Genome Viewer) mediante l'analisi bioinformatica di 3 varianti genetiche:

- la mutazione emizigosi c.6413C>A con sostituzione amminoacidica p.Ser2138Tyr del gene *F8*;
- la mutazione in eterozigosi c.1092G>A con sostituzione amminoacidica p.Glu435Lys del gene *F2*;
- la mutazione in eterozigosi c.2878C>T con sostituzione amminoacidica p.Arg960Trp del gene *VWF*.

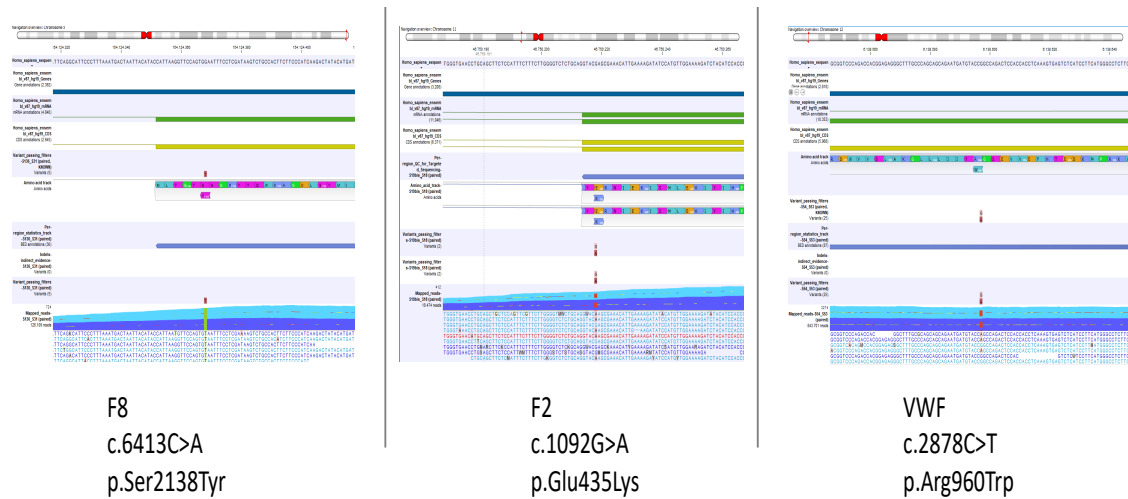


Figura 27. Output ottenuto da Integrative Genome Viewer (IGV) mediante analisi bioinformatica

Infine, si è identificata una inserzione di una T nella sequenza esonica del gene *F8* che porta a un segnale di stop (TAA) e quindi al *fattore VIII* non funzionante che causa Emofilia di tipo A.



Figura 28. Inserzione T con stop coding TAA (reverse). Wild type: KKNLNS; Inserzione T: KKKstop coding

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le malattie emorragiche e trombotiche congenite (METC) sono un gruppo di patologie causate da disfunzione di uno o più fattori della coagulazione o del numero e della funzione delle piastrine, con conseguenze fenotipiche che variano dalla tendenza al sanguinamento spontaneo alla trombosi venosa profonda o arteriosa. Le METC comprendono difetti coagulativi rari dei fattori della coagulazione, le Emofilie, la malattia di Von Willebrand, e degli enzimi che regolano la fibrinolisi. In questi anni, l'analisi molecolare e genetica sulle malattie METC ha avuto un forte impulso nell'ambito scientifico, diagnostico e terapeutico soprattutto grazie allo sviluppo di piattaforme di sequenziamento di nuova generazione, Next Generation Sequencing (NGS). In questo studio retrospettivo abbiamo disegnato un pannello genetico di 33 geni coinvolti nella cascata coagulativa, nella fibrinolisi e nel rischio trombotico. I nostri risultati hanno confermato sia la presenza di varianti genetiche note che di nuovi varianti che si associano alle malattie emorragiche e trombotiche congenite e che potrebbero avere un impatto sul processo decisionale clinico e pianificare programmi di screening e di prevenzione terapeutica efficace per la gestione dei pazienti affetti da METC.

Tra i diversi geni indagati in questo studio ci siamo soffermati soprattutto sul gene che codifica per il *Fattore II (F2)*, *Fattore VIII (F8)*, *Fattore IX (F9)*, il *Plasminogeno (PLG)*, *Proteina S (PROS1)*, e il *fattore di Von Willebrand (VWF)*.

1. Gene F2

La protrombina, o fattore della coagulazione II, è molto presente a livello della circolazione sanguigna, infatti, all'interno della cascata coagulativa, viene convertita in trombina attraverso il complesso di protrombinasi. La trombina risulta importante perché catalizza la conversione del fibrinogeno in un coagulo insolubile di fibrina.

La protrombina è una vitamina K dipendente, questo zimogeno è composto da un dominio gamma carbossiglutammino, Kringle-1, Kringle-2 e da un dominio di proteasi

con catena A e un dominio catalitico con catena B. ⁽⁵⁾ Il gene *F2* con mutazione G20210A si trova al secondo posto come trombofilia ereditaria, subito dopo il Fattore V di Leiden; si ritiene che abbia un'incidenza particolare in base all'etnia del paziente, con frequenza maggiore nella popolazione africana ed asiatica. ⁽⁶⁾

La variante p.Arg541Trp, citata in letteratura, è classificata come un nuovo rischio genetico per la predisposizione alla tromboembolia venosa. Da recenti studi sono stati trattati dei probandi che presentano una storia genetica di trombofilia con episodi trombotici. Non si sono trovate delle anomalie per il fattore V e la proteina C ed S che sono coinvolti nella cascata coagulativa in associazione con la protrombina. Si è notato come la via della proteina C fosse direttamente correlata all'ipercoagulabilità per un suo difetto funzionale causato dalla variante. Inoltre, si è visto come la resistenza all'antitrombina sia molto più rallentata con Arg541Trp rispetto la variante Arg596, comunque presenta una certa inibizione all'azione dell'antitrombina e anche dell'eparina. ⁽⁷⁾

La trombofilia è una condizione per cui il sangue tende a coagulare in maniera incontrollata portando a ipercoagulabilità e formazione di trombi che non dissolvendosi facilmente possono portare a patologie secondarie.

Il trattamento farmacologico della trombofilia è incentrato sull'uso di anticoagulanti come terapia o prevenzione secondaria ad episodio trombotico, specialmente anticoagulanti orali. La terapia che veniva preferita era l'uso di farmaci antagonisti della vitamina K, in particolar modo il Warfarin; le nuove terapie in studio per via orale sono ad esempio Dabigatran, Rivaroxaban, Edoxaban. Si è dimostrato che il Dabigatran con un uso continuativo per 6 mesi, in sostituzione al Warfarin, ha portato ad un miglioramento a livello delle lesioni necrotiche della pelle. Il Rivaroxaban in una terapia continuativa di due mesi non ha portato ad alcun miglioramento a livello dell'ostruzione venosa, si è dovuto far uso di eparine in concomitanza di questo farmaco; l'aspetto positivo che si è avuto dal Rivaroxaban è il ritorno dei normali livelli clinici di antitrombina. ⁽⁸⁾

2. Gene F8

Il fattore VIII contribuisce nella cascata coagulativa formando il complesso tenasico, è noto come fattore antiemofiliaco. Una sua mutazione induce un difetto di sintesi e una possibile carenza, in particolar modo nell'uomo, le donne risultano portatrici sane; si può manifestare con lo stato patologico dell'emofilia A, patologia ereditaria recessiva legata al cromosoma X.

L'emofilia è una malattia genetica che si manifesta con la tendenza da parte del paziente al sanguinamento. La gravità dell'emofilia viene definita dalle manifestazioni emorragiche complessive, il fenotipo clinico individuale varia all'interno di ciascun gruppo.

La diagnosi di basa sul test aPTT e il calcolo dei livelli residui di FVIII o FIX viene effettuato confrontando l'aPTT misurato nel plasma in esame (plasma carente di FVIII o di FIX) con quello misurato in campioni con una determinata concentrazione di FVIII o FIX.

La terapia farmacologica nei pazienti affetti da emofilia si è incentrata sull'uso di prodotti dei fattori stessi FVIII e FIX con azione farmacocinetica mirata ad offrire un miglioramento ed un controllo della sintomatologia con somministrazioni parenterali regolari.

Emicizumab è un anticorpo bifenotipico con specificità sia per FIX che per FX e imita il ruolo del FVIII nel complesso tenasico, localizzando FIXa abbastanza vicino a FX per consentire l'attivazione e il contributo a valle della cascata della coagulazione.

Emicizumab viene somministrato ogni 7, 14 o 28 giorni tramite iniezione sottocutanea, gli eventi di sanguinamento improvviso si verificano ancora, anche se il tasso di sanguinamento diminuisce nel tempo.

Il farmaco è autorizzato per la profilassi sottocutanea di routine per prevenire o ridurre la frequenza degli episodi emorragici nei soggetti affetti da emofilia A e B. Il

suo utilizzo si è visto possa portare ad un'effetto collaterale di complicanze trombotiche.

Gli anticorpi monoclonali anti-TFPI sono oggetto di studio in studi clinici e potrebbero essere utili anche per il deficit di FIX.

La terapia genica per l'emofilia sembra destinata a diventare presto una realtà in ambito clinico. Gli studi sono promettenti sia per l'emofilia A che per l'emofilia B. Il potenziale della terapia genica nel mantenere livelli appropriati di fattori.

Lo sviluppo di inibitori rappresenta oggi la sfida principale per il trattamento dell'emofilia. La ricerca ha fatto progredire la nostra comprensione degli aspetti immunologici e clinici sottostanti degli inibitori, e lo sviluppo di terapie non sostitutive come l'agente bypassante degli inibitori del fattore VIII, emicizumab ha migliorato le possibilità di trattare e prevenire i sanguinamenti in questi pazienti. Emicizumab si è affermato come l'agente emostatico preferito per la profilassi sia nei bambini che negli adulti con inibitori ad alto titolo. ⁽⁹⁾

3. Gene F9

Il fattore IX, con attività procoagulante, è un fattore vitamina K dipendente. La presenza di varianti porta a difetti di sintesi e carenza, una patologia ereditaria recessiva legata al cromosoma X. Risulta molto simile al fattore VIII, in questo caso la manifestazione patologica è dell'emofilia B; può manifestarsi con gravi sanguinamenti occasionali.

La variante p. Arg191His è una mutazione localizzata nel sito di scissione N-terminale del peptide di attivazione. Questa mutazione non è stata osservata in nessun paziente con risultati non discrepanti. Nel database delle varianti FIX sono principalmente da lievi a moderati. I pazienti, secondo lo studio analizzato, con questo genotipo sono stati classificati con diversi gradi di emofilia a seconda del metodo utilizzato. Tutti i pazienti nello studio sembrano avere un fenotipo senza sanguinamento, suggerendo una migliore previsione mediante il test cromogenico. ⁽¹⁰⁾

4. Gene *PLG*

Il plasminogeno è uno zimogeno secreto a livello della circolazione sanguigna, la sua attivazione avviene in seguito a proteolisi convertendosi in plasmina. Quest'ultima è una serina proteasi che degrada i coaguli di fibrina. È stato dimostrato che il plasminogeno svolge un ruolo cruciale in altri processi cellulari come la guarigione delle ferite, l'immunità, l'infiammazione.

In recenti studi sugli animali, si è visto come la somministrazione di plasminogeno avesse permesso la rigenerazione e guarigione del timpano. Si è notato come pazienti con l'otite media avessero un'espressione di *PLG* molto bassa o anche assente. La patologia in questione è una malattia molto comune nei bambini piccoli, può portare a perdita dell'udito se non trattata.

Gli studi riportati in letteratura identificano la presenza di alcune varianti rare del gene *PLG* ed esso quando in carenza risulta associato a malattie immunitarie, infiammatorie.

Alcune nuove varianti si trovano vicino ai legami disolfuro tra i residui di cisteina che sono potenzialmente importanti per la stabilizzazione delle proteine. In particolare modo, le varianti influenzano la stabilità e l'attività enzimatica, le proteine potrebbero risentirne.

La variante p.Ala494Val si verifica all'interno del dominio KR5 della catena β 26. Il dominio KR5 rappresenta un'area importante per il cambiamento di conformazione da chiuso ad aperto tramite il legame della fibrina ai siti di legame della lisina presenti in questo dominio. Non si sono osservati dei cambiamenti a livello dei legami H di questa variante rispetto alla proteina sana e, in base alla posizione della variante valina, si prevede che l'effetto della catena laterale sulla valina sia minimo. ⁽¹¹⁾

La variante p.Lys38Glu porta i pazienti che la presentano ad avere una carenza di *PLG* e si manifesta con ipoplasminogenemia, corrispondente ad un deficit quantitativo.

Il sintomo più comune dell'ipoplasminogenemia grave è la congiuntivite lignea ed è associata a una compromissione della clearance extracellulare della fibrina durante la guarigione della ferita, che porta a lesioni pseudomembranose (lignee) sulle membrane mucose colpite, principalmente negli occhi. ⁽¹²⁾

L'otite media si tratta con farmaci antibiotici principalmente e la terapia varia in base alla gravità dei sintomi, l'età del paziente. L'antibiotico di prima linea nella cura dell'otite media consiste nell'amoxicillina ad alte dosi, 80-90 mg per Kg al giorno in due dosi. In caso di assunzione dell'amoxicillina nei 30 giorni precedenti si può utilizzare l'amoxicillina/clavulanato. Nell'allergia da penicillina possono essere sostituiti con l'uso dell'azitromicina, farmaco anch'esso di prima linea. ⁽¹³⁾

5. Gene *PROS1*

La proteina S (PS) è una proteina plasmatica vitamina K-dipendente, stimola l'attività anticoagulante della proteina C attivata.

Il deficit acquisito di proteina S può verificarsi in una varietà di condizioni cliniche, tra cui la gravidanza, l'uso di contraccettivi orali, diabete mellito di tipo 1, malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico, sindrome nefrosica.

La variante p. Arg233Lys è stata analizzata e data la natura conservativa della sostituzione dell'amminoacido questo appare neutro. I livelli di PS nei pazienti presentanti la variante risultano normali, non risulta particolarmente significativo. ⁽¹⁴⁾

La variante p. Thr78Met presenta livelli di PS libero più elevati rispetto ai partecipanti eterozigoti. Per valutare l'influenza della variante si è valutata l'interferenza con il test del PS libero, confrontandolo con l'attività della proteina S nei casi disponibili. Non si è riscontrata alcuna differenza tra i valori analizzati, dimostrando come p. Thr78Met possa causare livelli di PS solo leggermente ridotti. Si è visto anche come in questi pazienti non ci fossero episodi di tromboembolia venosa (TEV); tuttavia, si è riscontrata trombosi arteriosa cerebrale (TEA), con anche complicazioni durante una gravidanza.

L'indagine sulla trombofilia viene generalmente eseguita in pazienti di età inferiore a 50 anni a causa di TEV inspiegabile così come di eventi di trombosi arteriosa cerebrale (TEA) inspiegabili o TEA periferico. Inoltre, i familiari di persone con grave trombofilia, ad esempio carenza di anticoagulanti naturali, vengono sottoposti ad accertamenti sulla trombofilia. Si vanno a esaminare le donne con complicanze della gravidanza, mentre le giovani donne vengono sottoposte a test prima dell'uso della pillola contraccettiva, se è evidente una predisposizione familiare alla malattia tromboembolica venosa. ⁽¹⁵⁾

La variante p. Ser501Pro è associata alla proteina S Heerlen (PSH), un polimorfismo di cambiamento dell'amminoacido che causa una perdita di glicosilazione legata all'N, era considerato un polimorfismo neutro.

Il deficit ereditario di proteina S (PS) è un raro disturbo della coagulazione associato ad un aumentato rischio di trombosi venosa (VT). ⁽¹⁶⁾

6. Gene VWF

La malattia di von Willebrand (VWD) è caratterizzata da manifestazioni cliniche che ne complicano la diagnosi. La gestione clinica della VWD è rimasta sostanzialmente invariata negli ultimi 30 anni circa, utilizzando concentrati di fattore di von Willebrand (VWF), desmopressina e agenti antifibrinolitici come strumenti principali per controllare il sanguinamento. In contrasto le terapie utilizzate per il trattamento dell'emofilia A risultano molto più innovative e ricercate.

Si è visto come la gestione della VWD non sia così efficace, dato che la qualità della vita risulta un peso sui pazienti, in particolare nelle donne.

Lo sviluppo di trattamenti innovativi per la VWD è complesso, soprattutto data l'eterogeneità della malattia e la natura multifunzionale della VWF.

I vantaggi principali del trattamento di scelta desmopressina sono diversi, in particolare modo nelle VWD di tipo 1, come i diversi metodi di somministrazione, relativamente economico e privo di rischio di malattie trasmissibili.

Gli ostacoli nella costruzione di una terapia genica sono diversi e rendono difficile la loro attuazione, in primis la multimerizzazione del VWF.

Un'altra strategia include l'uso di anticorpi a dominio singolo fusi con una porzione legante l'albumina. In questo approccio, tale proteina di fusione collegherebbe il VWF circolante all'albumina, sfruttando la lunga emivita dell'albumina e così indurrebbe un'emivita prolungata per il VWF e aumenterebbe i suoi livelli.

L'eccessiva degradazione del VWF è un problema particolare nella VWD congenita di tipo 2, ma anche in alcune varianti della sindrome di von Willebrand acquisita. Sebbene il VWD congenito di tipo 2 possa essere trattato utilizzando concentrati di VWF, questo è più complicato nella sindrome di von Willebrand acquisita perché sembra concepibile che anche il VWF infuso sia suscettibile alla degradazione mentre passa attraverso le pompe. Per ridurre la degradazione del VWF, è possibile utilizzare anticorpi per interferire con le interazioni. È importante sottolineare che l'inibizione della degradazione del VWF dovrebbe essere limitata per evitare effetti collaterali trombotici come osservato nella porpora trombotica trombocitopenica. ⁽¹⁷⁾

Il fattore di Von Willebrand svolge un ruolo essenziale nell'emostasi primaria associata a emorragia patologica e trombosi arteriosa. È la malattia emorragica congenita più comune ed è causata da un VWF plasmatico difettoso o carente. Sono state descritte tre categorie principali di VWD: il tipo 1 è identificato da un deficit quantitativo parziale di VWF; il tipo 2 comprende pazienti con anomalie qualitative; il tipo 3 è caratterizzato da livelli di VWF non rilevabili.

La terapia sostitutiva con concentrati di FVIII/VWF (o VWF ricombinante) è la scelta terapeutica ottimale in tutti i sottotipi di VWD. L'esposizione ripetuta a questi prodotti in pazienti affetti da VWD di tipo 3 può indurre la produzione di alloanticorpi anti-VWF, causando successive reazioni allergiche o anafilattiche post-infusione.

Emicizumab è un anticorpo monoclonale (mAb) ricombinante bispecifico che si lega a FIX/FIX attivato (FIXa) e FX/FXa e imita l'attività del cofattore FVIIIa nel complesso tenasico sulle membrane fosfolipidiche. Emicizumab a concentrazioni plasmatiche

cl clinicamente rilevanti (~50 µg/ml) sembra mediare il 15~20% della generazione di trombina e del potenziale di coagulazione rispetto a quello del complesso tenasico nativo.

I dati hanno indicato che emicizumab può essere utile come terapia alternativa per questi sottotipi di VWD. ⁽¹⁸⁾

La variante p. Pro2063Ser è un polimorfismo neutro comune nella malattia del VWF. L'analisi in silico utilizzando predittori hanno dimostrato che p. Pro2063Ser potrebbe essere la probabile causa di questa malattia.

Tuttavia, studi in vitro indicano che la variante non influenza l'espressione genica, questo potrebbe suggerire che la variante sia neutra. Nello studio preso in considerazione, tutti i pazienti portatori di p. Pro2063Ser avevano anche la variante p. Arg324* in omozigosità, suggerendo così che nella nostra popolazione p. Pro2063Ser non è la variante che causa la malattia.

Lo studio in analisi utilizza un pannello genetico NGS e hanno determinato il genotipo di diversi pazienti con VWD di tipo 3. ⁽¹⁹⁾

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che la tecnologia di sequenziamento NGS rappresenta una valida strategia per l'analisi delle varianti genetiche presenti nelle forme rare delle malattie emorragiche e trombotiche e contribuiscono a consolidare la conoscenza relativa alle basi genetiche di tale patologia. Inoltre, lo studio del ruolo fisiopatologico di queste mutazioni potrà fornire utili informazioni per lo sviluppo di efficaci terapie farmacologiche.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) Michael Laposata, Medicina di laboratorio, *La diagnosi di malattia nel laboratorio clinico*, ed. Piccin, 2021
- (²) Marcello Ciaccio, Giuseppe Lippi, *Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio*, III edizione, EdiSES Università S.r.l. - Napoli, 2020
- (³) Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, Goodman & Gilman, *Le basi farmacologiche della terapia, Il manuale*, Gennaio 2015
- (⁴) Sue Richards, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W Grody, Madhuri Hegde, Elaine Lyon, Elaine Spector, Karl Voelkerding, Heidi L Rehm, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of the Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*, Maggio 2015
- (⁵) Nicola Pozzi and Enrico di Cera, Edward A. Doisy Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, MO 63104, USA, *Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities*, Dicembre 2014
- (⁶) Sherif Elkattawy, MD¹, Ramez Alyacoub, MD¹, Kerry S. Singh, MD², Hardik Fichadiya, MD¹, and William Kessler, MD¹, *Prothrombin G20210A Gene Mutation-Induced Recurrent Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Case Report and Literature Review, Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 2022
- (⁷) Xi Wu,* Jing Dai,* Xiaoqian Xu, Fang Li, Lei Li, Yeling Lu, Qin Xu, Qiulan Ding, Wenman Wu, Xuefeng Wang, *Prothrombin Arg541Trp Mutation Leads to Defective PC (Protein C) Pathway Activation and Constitutes a Novel Genetic Risk Factor for Venous Thrombosis*, Febbraio 2020
- (⁸) Jessica W. Skelley, C. Whitney White, Angela R. Thomason, *The use of direct oral anticoagulants in inherited thrombophilia*, 12 ottobre 2016

(⁹) Erik Berntorp ^{1,2}, Kathelijin Fischer ³, Daniel P. Hart^{4,5}, Maria Elisa Mancuso⁶, David Stephensen ^{4,7}, Amy D. Shapiro⁸ and Victor Blanchette^{9,10}, *Haemophilia*, Giugno 2021

(¹⁰) K. KIHLEBERG,* K. STRANDBERG,† S. ROSEN,‡ R. LJUNG§ and J. ASTERMARK*, *Discrepancies between the one-stage clotting assay and the chromogenic assay in haemophilia B*, 2017

(¹¹) Tori c. Bootpetch¹, Lena Hafrén², christina L. Elling^{1,3}, Erin e. Baschal¹, Ani W. Manichaikul⁴, Harold S. pine⁵, Wasyl Szeremeta⁵, Melissa A. Scholes^{1,6}, Stephen p. cass¹, eric D. Larson¹, Kenny H. chan^{1,6}, Razaqat ishaq⁷, Jeremy D. prager^{1,6}, Rehan S. Shaikh⁷, Samuel p. Gubbels¹, Ayesha Yousaf⁸, University of Washington center for Mendelian Genomics (UW-cMG)*, Todd M. Wine^{1,6}, Michael J. Bamshad⁹, patricia J. Yoon^{1,6}, Herman A. Jenkins¹, Deborah A. Nickerson⁹, Sven-olrik Streubel^{1,6}, norman R. friedman^{1,6}, Daniel n. frank¹⁰, Elisabet Einarsdottir^{11,12}, Juha Kere^{11,12,13}, Saima Riazuddin⁷, Kathleen A. Daly¹⁴, Suzanne M. Leal¹⁵, Allen f. Ryan¹⁶, petri S. Mattila², Zubair M. Ahmed⁷, Michele M. Sale^{4,17,18}, Tasnee Chonmaitree¹⁹ & Regie Lyn p. Santos-cortez^{1,20*}, *Multi-omic studies on missense PLG variants in families with otitis media*, Settembre 2020

(¹²) Buket Dö nmez-Demir ^a, Tiraje Celkan ^b, Nazan Sarper ^c, Gü lhis Deda ^d, Elif Ince ^e, Ü mran Ç alı ş kan ^f, Gü l yü z Ö ztü rk ^g, Barbaros Karagü n ^h, Alphan Kü pesiz ⁱ, Hü seyin Tokgö z ^f, Nejat Akar ^j and Hilal Ö zdağ ^a, *Novel plasminogen gene mutations in Turkish patients with type I plasminogen deficiency*, 2016

(¹³) Heidi L. Gaddey, MD, Matthew Thomas Wright, DO, Tracy N. Nelson, MD, *Otitis Media: Rapid Evidence Review*, Settembre 2019

(¹⁴) Begoña Hurtado,^{1,5} Xavier Muñoz,^{1,5} Maria Carme Mulero,¹ Gemma Navarro,² Pere Domènech,³ Pablo García de Frutos,⁴ Mercè Pérez-Riba,^{1*} and Núria Sala^{1*},

Functional characterization of twelve natural PROS1 mutations associated with anticoagulant protein S deficiency, 2008

(¹⁵) Ole Halfdan Larsen^{1,2} Alisa D. Kjaergaard³ Anne-Mette Hvas^{2,3} Peter H. Nissen^{2,4}, *Genetic Variants in the Protein S (PROS1) Gene and Protein S Deficiency in a Danish Population*, Ottobre 2021

(¹⁶) P. Suchon^{1,2}, M. Germain^{3,4}, A. Delluc⁵, D. Smadja^{6,7}, X. Jouven^{8,9,10}, B. Gyorgy^{3,4}, N. Saut¹, M. Ibrahim^{1,2}, J. F. Deleuze^{11,12}, M. C. Alessi^{1,2}, P. E. Morange^{1,2,*} & D. A. Trégouët^{3,4,*}, *Protein S Heerlen mutation heterozygosity is associated with venous thrombosis risk*, Aprile 2017

(¹⁷) Cécile V. Denis, Sophie Susen, and Peter J. Lenting, *Von Willebrand disease: what does the future hold?*, Aprile 2021

(¹⁸) Hiroaki Yaoi, Yasuaki Shida, Kenichi Ogiwara, Takehisa Kitazawa, Midori Shima, Keiji Nogami, *Emicizumab enhances thrombus formation in vitro under high shear flow conditions in whole blood from patients with type 1 and type 3 von Willebrand disease*, 2022

(¹⁹) Ana Paula Ornaghi, Mariana Rost Meireles, Mariana Rodrigues Botton, Ursula Matte, Francisco Mauro Salzano, Eliane Bandinelli, *Variants p. Pro2063Ser and p. Arg324* co-segregate in type 3 von Willebrand disease patients from Southern Brazil*, 2021

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a chi ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va al mio relatore Ceolotto Giulio che mi ha seguita nella realizzazione e stesura della tesi.

Grazie anche alla mia correlativa Giannella Alessandra che mi ha seguita, insieme a Benetti Andrea, nell'affrontare e comprendere la bellezza che si cela dietro la ricerca. Ringrazio più di tutti, infinitamente, i miei genitori che mi hanno sempre sostenuta ed aiutata durante tutto il mio percorso, senza i quali non avrei realizzato tutto questo. Fondamentali sono stati anche i miei parenti: mio fratello, la nonna, la zia che ci sono sempre stati e hanno sopportato le mie lamentele, mi hanno vista demoralizzata ma mi hanno visto anche molte volte felice per ciò che avevo ottenuto.

Grazie al mio ragazzo Lorenzo che mi è stato vicino, mi ha sostenuta e mi ha compresa nei miei momenti no.

Ringrazio i miei compagni di corso, le uscite in gruppo con "Le cicchette" come il secondo anno a Venezia dove volevamo prenotare il viaggio a Ibiza, le risate, le pause in aula studio. Sono state importanti lungo il mio percorso soprattutto, Jessica e Martina che mi hanno spronata con la loro voglia di fare. In particolare, la Kim che tra una risata, un piantino e una bevuta per festeggiare gli ultimi esami mi è stata sempre vicina e ci siamo incoraggiate a vicenda.

Grazie a tutti quelli del laboratorio del Campus Biomedico per i divertenti pranzi in compagnia e l'aiuto fornito al momento del bisogno. In particolare, l'Alessia con cui le colazioni sono state sempre una chiacchiera piacevole e le giornate in laboratorio più sopportabili.

Raramente ci rendiamo conto che siamo circondati dallo straordinario.

Grazie infinite a tutti voi!