



**Variante nucleotidica C677T del gene MTHFR  
e aborto spontaneo nell'ambito della  
medicina della riproduzione**

**Lavoro di diploma**

**di Guarna Gloria**

Formazione Tecnica in Analisi Biomediche  
Scuola Superiore Medico Tecnica, Locarno  
Anno scolastico 2009/2010

**Laboratorio di genetica molecolare ProCreaLab  
Clinica ProCrea, Lugano**

**Responsabili:** Dr. ssa Filippini Giuditta PhD FAMH Gen. Med.  
MSc Spalvieri Sara

## INDICE

<b>1. RIASSUNTO / ABSTRACT</b>	<b>p. 4</b>
<b>2. ABBREVIAZIONI</b>	<b>p. 5</b>
<b>3. INTRODUZIONE</b>	<b>p. 6</b>
3.1. La variante nucleotidica C677T del gene MTHFR	p. 6
3.2. L'iperomocisteinemia	p. 9
3.2.1. Acido folico, vitamina B <sub>12</sub> e vitamina B <sub>6</sub>	p. 10
3.3. La trombofilia	p. 10
3.4. L'aborto spontaneo	p. 11
3.5. Stato dell'arte	p. 12
3.6. Obiettivo dello studio	p. 13
3.7. Ambito di studio	p. 13
<b>4. MATERIALE</b>	<b>p. 15</b>
4.1. Scelta e selezione dei campioni	p. 15
4.2. Raccolta dei dati	p. 15
4.3. Consenso informato	p. 16
4.4. Materiale per l'analisi della variante nucleotidica C677T del gene MTHFR	p. 17
<b>5. METODI</b>	<b>p. 18</b>
5.1. L'analisi della variante nucleotidica C677T del gene MTHFR	p. 18
5.1.1. Protocollo di analisi	p. 18
5.1.1.1. Estrazione del DNA	p. 19
5.1.1.2. Mini-sequencing mediante la tecnica di SNaPShot	p. 20
5.1.2. L'apparecchio Genetic Analyzer ABI PRISM 310	p. 22
5.1.2.1. Introduzione	p. 22
5.1.2.2. Funzionamento e principio dell'apparecchio	p. 22
5.1.2.3. Software Data Collection	p. 24
5.1.2.4. Software GeneScan Analysis 3.7	p. 24
5.1.3. Interpretazione e conformità del risultato	p. 24
5.1.4. Controlli	p. 26
5.1.5. Limiti della metodica	p. 26
5.1.6. Interferenze	p. 26
5.2. Analisi statistica dei dati	p. 27
<b>6. RISULTATI</b>	<b>p. 28</b>

<b>7. DISCUSSIONE</b>	<b>p. 31</b>
7.1. Premessa	p. 31
7.2. Discussione	p. 32
<b>8. CONCLUSIONI</b>	<b>p. 35</b>
8.1. Applicazioni future	p. 35
<b>9. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>p. 37</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>p. 38</b>
<b>11. ALLEGATI</b>	<b>p. 40</b>
11.1. Allegato 1: Passaggi generali di un'analisi genetica molecolare	p. 40
11.2. Allegato 2: Passaggi dell'analisi della variante nucleotidica C677T del gene MTHFR	p. 41
11.3. Allegato 3: Protocollo di estrazione del DNA genomico da sangue periferico, tramite procedura di centrifugazione (QIAGEN)	p. 42
11.4. Allegato 4: Protocollo di analisi della variante nucleotidica C677T del gene MTHFR (tecnica di SNaPSHOT, AB)	p. 44
11.5. Allegato 5: Elettroferogrammi (Genetic Analyzer ABI Prism 310): esempi dei tre genotipi MTHFR C677T	p. 49

## 1. RIASSUNTO

La metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è un enzima coinvolto nel ciclo metabolico dell'omocisteina (Hcy), che porta alla rimetilazione della metionina (Met). La variante nucleotidica C677T del gene MTHFR provoca una diminuzione dell'attività enzimatica e conseguente iperomocisteinemia. Tale condizione determina un aumentato rischio di sviluppare patologie vascolari di tipo trombofilico. Si ritiene che questa variante genetica possa avere una correlazione con la predisposizione all'abortività spontanea. L'obiettivo specifico dello studio è valutare il ruolo e l'incidenza della variante nucleotidica C677T del gene MTHFR in pazienti con aborto spontaneo. È stato esaminato il genotipo MTHFR C677T di donne con anamnesi clinica positiva per gli aborti spontanei (gruppo di studio) e di donne con anamnesi clinica negativa per tali eventi (gruppo di controllo). L'analisi del genotipo è stata eseguita tramite mini-sequencing (SNaPShot), su DNA genomico estratto da sangue periferico. Il test statistico Z è stato utilizzato per confrontare la frequenza dei diversi genotipi e la loro relativa frequenza allelica nei due gruppi. I risultati dello studio confermano il significativo ruolo della variante genetica MTHFR C677T nella predisposizione all'aborto spontaneo, mettendo in evidenza una significativa associazione del genotipo omozigote T/T di tale variante genetica con l'incidenza di aborti spontanei.

## ABSTRACT

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an enzyme involved in the homocysteine (Hcy) metabolic cycle, which leads to the methionine (Met) remethylation. MTHFR C677T gene nucleotidic variation causes a decrease of the enzymatic activity and consequently hyperhomocysteinaemia. This condition leads to a higher risk of developing vascular thrombophilic diseases. We consider that this genetic variation could be correlated with the predisposition to spontaneous miscarriages. The specific objective of this study is to evaluate the role and the incidence of MTHFR C677T gene nucleotidic variation in spontaneous miscarriage events. The C677T MTHFR genotype of women with a positive clinical history of spontaneous miscarriages (study group) and that of women with a negative clinical history of these events (control group) was examined. The genotype analysis was performed by mini-sequencing (SNaPShot) on genomic DNA extracted from peripheral blood. Statistical Z test was used to compare the frequency of the different genotypes and their relative allelic frequency in the two groups. The study results confirm the significant role of the MTHFR C677T genetic variation in predisposition to spontaneous miscarriage, emphasizing a significant association of T/T homozygous genotype of this genetic variation with the incidence of spontaneous miscarriages.