

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

**Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali**

**Indirizzo: Scienze Geriatriche ed Ematologiche**

**XXIII° Ciclo**

*Resistenza all'aspirina in pazienti affetti da  
Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale:  
caratteristiche biomolecolari e della funzionalità  
piastrinica.*

**Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene**

**Coordinatore dell'Indirizzo: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris**

**Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Luigia Randi**

Dottoranda: Dr.ssa Nicole Candeo

## INDICE

<b>Riassunto:</b>	.....pag. 3
<b>Summary:</b>	.....pag. 5
<b>Introduzione:</b>	.....pag. 7
<b>Pazienti:</b>	.....pag. 27
<b>Materiali e Metodi:</b>	.....pag. 31
<b>Risultati:</b>	.....pag. 41
<b>Discussione:</b>	.....pag. 53
<b>Conclusioni:</b>	.....pag. 61
<b>Bibliografia:</b>	.....pag. 63



# RIASSUNTO

## INTRODUZIONE

L'uso di aspirina a basse dosi (100mg/die) previene gli eventi trombotici migliorando del 22% la probabilità di sopravvivenza dei soggetti che hanno sofferto di problemi cardiovascolari.

Tuttavia, si stima che circa un quarto dei soggetti in terapia vadano ugualmente incontro a manifestazioni tromboemboliche (resistenza all'aspirina). E' descritta anche una resistenza farmacologica, quando cioè il farmaco non è in grado di inibire efficacemente l'aggregazione piastrinica e la produzione di trombossano. Le cause della resistenza non sono ancora ben chiare: sono state prese in considerazione la non-compliance dei pazienti, l'incompleto assorbimento del farmaco, la mancata inibizione di COX-1, le alterazioni genetiche della Glicoproteina IIIa (GPIIIa) (HPA-1).

Anche i soggetti affetti da neoplasie mieloproliferative (MPN) sono a rischio di complicanze tromboemboliche e lo studio ECLAP ha dimostrato che 100 mg/die di aspirina sono efficaci anche in questi pazienti per la prevenzione di eventi cardiovascolari. La quasi totalità dei pazienti affetti da policitemia vera (PV) e circa la metà di quelli con trombocitemia essenziale (ET) sono portatori della mutazione puntiforme ed acquisita a carico del gene della Janus Kinasi 2 (JAK2); la mutazione sostituisce con una fenilalanina una valina di piccole dimensioni in posizione 617 dell'esone 14 (V617F). Tale mutazione sembra essere un fattore di rischio protrombotico per i pazienti affetti da MPN.

## SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo principale del nostro studio è stato determinare se effettivamente la resistenza clinica e/o farmacologica all'aspirina si verifici anche nei pazienti affetti da MPN. Si è inoltre cercata una correlazione tra resistenza all'aspirina e alcune variazioni genetiche, in particolare la mutazione JAK2V617F e il polimorfismo HPA-1. Abbiamo valutato infine l'utilità dell'aggregazione piastrinica e del dosaggio del trombossano (TxB2) sierico per riconoscere la non-responsività all'aspirina in questi particolari pazienti.

## PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati 83 pazienti affetti da MPN in terapia con aspirina (100mg/die) (MPN in ASA), 40 pazienti con MPN alla diagnosi non ancora in trattamento (MPN basali), 50 pazienti in terapia con aspirina (100mg/die) (Controlli in ASA) e 42 soggetti sani (Controlli).

E' stata ricercata la mutazione JAK2 V617F mediante PCR allele-specifica. Il polimorfismo HPA-1 è stato ricercato con discriminazione allelica in real time PCR. La resistenza farmacologica è stata studiata con aggregazione indotta da acido arachidonico (AA) secondo metodo di Born e il dosaggio del trombossano B2 (TxB2) sierico con metodica ELISA.

Le differenze nella distribuzione genotipica tra i diversi gruppi di pazienti sono state valutate mediante test del  $\chi^2$  e test di Fisher. Si è utilizzata una curva ROC per determinare un valore di cut-off per i livelli di TxB2. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software GraphPad Prism5, considerando come soglia di significatività  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

La mutazione JAK2V617F è stata trovata nel 90.1% dei pazienti affetti da PV e nel 75.6% dei casi con ET. L'incidenza della mutazione JAK2V617F negli MPN trattati e non trattati con aspirina non era statisticamente diversa. L'incidenza delle complicanze trombotiche non è statisticamente maggiore nei casi portatori di mutazione

JAK2V617F ( $p=0.15$ ). Dei 25 pazienti che hanno sofferto di complicanze trombotiche, 23 (92%) erano portatori della mutazione JAK2V617F mentre la mutazione era presente nel 71% dei casi senza complicanze trombotiche ( $p=0,0172$ ).

La frequenza dell'allele b di HPA-1 è stata comparabile negli MPN che hanno o non hanno sviluppato trombosi ( $p=0,46$ ).

Due degli 83 pazienti (2,4%) che erano in terapia con ASA hanno sofferto di eventi tromboembolici-durante il trattamento.

Tutti i Controlli in ASA (100%) mostravano una curva di aggregazione soppressa ( $< 10\%$ ), mentre 22 MPN in ASA (26,5%) avevano curve di aggregazioni non sopresse ( $80\pm 16\%$ ). Né la presenza della mutazione JAK2V617F né quella dell'allele b influenzano la risposta all'aspirina in base ai risultati dell'aggregazione ( $p=0.8$  e  $p=0.42$ ).

Non è stata trovata alcuna differenza statistica nei livelli di TxB2 sierico tra i Controlli e gli MPN basali ( $p=0,75$ ), né tra gli MPN in ASA e i Controlli in ASA. Gli MPN basali hanno livelli di TxB2 sierico significativamente maggiori di quelli in ASA ( $p=0,0414$ ) e i Controlli significativamente superiori ai Controlli in ASA ( $p<0,0001$ ). Normalizzando i valori in base al numero di piastrine, non è stata trovata differenza tra Controlli ed MPN basali ( $p=0,5$ ), mentre erano significativamente più elevati i valori di TxB2 rilasciato dai Controlli rispetto ai Controlli in ASA ( $p=0,019$ ). Analogamente, i livelli di TxB2 si riducono dopo trattamento con aspirina nei pazienti MPN ( $p<0,0001$ ); tuttavia, gli MPN in ASA mostrano livelli significativamente più elevati rispetto ai Controlli in ASA ( $p<0,0001$ ). Con la costruzione di una curva ROC, si è stabilito che il valore di TxB2  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$  rappresenta il cut-off per distinguere i pazienti in cui la terapia con ASA determina efficace soppressione dei valori di TxB2. Nessuno dei Controlli e degli MPN basali mostrava un valore di TxB2 inferiore a  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$ , mentre tra i Controlli in ASA e gli MPN in ASA, 2 /21 (9,5%) e 37/77 (48%) rispettivamente, mostravano livelli maggiori del cut-off (resistenti). 18 MPN in ASA (25%) aggregavano normalmente e presentavano livelli di TxB2 elevato malgrado l'uso di aspirina (resistenti all'aspirina).

I 2 casi che hanno sviluppato complicanze trombotiche durante la terapia con aspirina avevano livelli di TxB2 maggiori di 948, ma solo in uno di essi l'aggregazione era soppressa.

### CONCLUSIONI

La mutazione JAK2V617F è risultata presente nella quasi totalità dei pazienti con eventi trombotici.

La presenza dell'allele raro b di HPA-1 non sembra correlabile con le complicanze trombotiche dei pazienti con MPN. Non sembra esistere alcuna relazione tra la presenza di mutazione JAK2 o dell'allele b e la resistenza all'aspirina. La resistenza all'aspirina non è diversa nei pazienti affetti da MPN e nella popolazione generale.

L'aggregazione piastrinica indotta da AA è risultata capace di identificare la resistenza all'aspirina in circa il 25% dei pazienti con MPN.

Il cut-off capace di stabilire la mancata soppressione del TxB2 da parte dell'aspirina è di  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$ . Un livello superiore a  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$  di TxB2 stabilisce la mancata inibizione della produzione di trombossano da parte dell'aspirina.

Il dosaggio del TxB2 è risultato capace di identificare la resistenza all'aspirina in circa la metà dei pazienti con MPN.

Non è stata riconosciuta alcuna relazione tra la resistenza clinica e la resistenza farmacologica.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

Low-dose aspirin (100mg/die) prevents thrombotic events by 22%, improving the survival probability of those subjects who have suffered from cardiovascular problems. However, literature reports that about 25% of the subjects treated with aspirin, presents thromboembolic events (aspirin resistance). Some Authors describe a “pharmacologic resistance”, that is intended when the drug is not able to effectively inhibit platelet aggregation and thromboxane production. Aspirin resistance causes are not well understood yet, they include: non-compliance of patients, incomplete absorption of the drug, lack of inhibition of COX-1, genetic alterations of glycoprotein IIIa (GPIIIa) (HPA-1). Patients affected by myeloproliferative neoplasms (MPN) are at risk for thromboembolic complications and ECLAP study showed that 100 mg/die of aspirin are also effective in these patients for the prevention of cardiovascular events. Almost all patients with polycythemia vera (PV) and about half of those with essential thrombocythemia (ET) are carriers of the acquired mutation in Janus kinase 2 gene (JAK2); this mutation substitutes a phenylalanine with a smaller valine in position 617 of exon 14 (V617F). This mutation appears to be a prothrombotic risk factor for MPN patients.

## AIM OF THE STUDY

The aim of our study was to determine if clinical and/or pharmacological resistance to aspirin may also occur in patients with MPN. We analyzed genetic variations, in particular JAK2V617F mutation and HPA-1 polymorphism, to evaluate the correlation with aspirin resistance. Subsequently, we tested the utility of platelet aggregation and serum thromboxane (TxB2) assay to detect the non-responsiveness to aspirin in these particular patients.

## PATIENTS AND METHODS

We studied 83 MPN patients treated with aspirin (100mg/die) (MPN in ASA), 40 patients with MPN diagnosis without aspirin treatment (MPN basal), 50 hospitalized patients treated with aspirin (100mg/die) (Controls in ASA) and 42 healthy subjects (Controls). We used an allele-specific PCR for JAK2V617F mutation and a real-time PCR allelic discrimination for HPA-1 polymorphism. Pharmacological resistance was studied using Born's platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA), and ELISA assay for serum thromboxane B2 (TxB2). Differences in genotyping distribution between different groups of patients were assessed by  $\chi^2$  test or Fisher exact test. We then created a ROC curve to obtain a TxB2 cut-off value. All the statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism5,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

The JAK2V617F mutation was found in 90.1% of PV patients and in 75.6% of ET. The incidence of JAK2V617F mutation in MPN treated and untreated with aspirin was not statistically different. The incidence of thrombotic complications was not statistically different between cases carrying or not JAK2V617F mutation ( $p = 0.15$ ).

Among the 25 patients, who suffered from thrombotic complications, 23 (92%) were carriers of the JAK2V617F mutation while the mutation was present in 71% of cases without thrombotic complications ( $p = 0.0172$ ).

The b allele (HPA-1) frequency was similar in the MPN who have or have not developed thrombosis ( $p = 0.46$ ).

Two of 83 patients (2.4%), treated with ASA have a history of thromboembolic events during treatment.

All Controls in ASA (100%) had an aggregation curve suppressed (<10%), while 22 MPN in ASA (26.5%) had aggregation curves not suppressed ( $80 \pm 16\%$ ). Neither the presence of the JAK2V617F mutation, nor of the b allele influence the response to aspirin based on the results of aggregation ( $p = 0.8$  and  $p = 0.42$ ). There was no statistical difference in levels of serum TxB2 between Controls and MPN basal ( $p=0.75$ ) or between the MPN in ASA and Controls in ASA. MPN basal serum TxB2 levels were significantly higher than those of MPN in ASA ( $p = 0.0414$ ) and Control levels were significantly higher than Controls in ASA ( $p <0.0001$ ). Normalizing values based on the number of platelets, no difference was found between Controls and MPN basal ( $p = 0.5$ ); values of Controls released TxB2 were significantly higher than in Controls in ASA ( $p = 0.019$ ). Similarly, between MPN basal and MPN in ASA the levels of TxB2 significantly decreased ( $p <0.0001$ ), but the MPN in ASA showed higher levels than Controls in ASA ( $p <0.0001$ ). Through the creation of a ROC curve, it was determined that the value of TxB2  $948 \text{ pg / plts} \times 10^{-8}$  was the cut-off to distinguish patients whose aspirin determines effective suppression of TxB2 values. None of the Controls and of MPN basal showed a TxB2 value of less than  $948 \text{ pg / plts} \times 10^{-8}$ , while among the Controls in ASA and MPN in ASA, 2/21 (9.5%) and 37/77 (48%) respectively, showed levels higher than cut-off (aspirin resistant). 18 MPN in ASA (25%) showed a normal aggregation curve and high levels of TxB2, despite the use of aspirin (aspirin resistant). The 2 patients, who developed thrombotic complications during therapy with aspirin, both presented TxB2 levels higher than 948, but only one showed a normal aggregation curve.

#### CONCLUSIONS

JAK2V617F mutation is present in almost all patients with thrombotic events. The presence of rare allele b of HPA-1 does not appear to be correlated with thrombotic complications in patients with MPN. There seems to be no relationship between the presence of JAK2 mutation or b allele and resistance to aspirin. Aspirin resistance is not different between MPN patients and general population. Platelet aggregation, induced by AA, can identify aspirin resistance in approximately 25% of patients with MPN. The cut-off capable of establishing the non-suppression of TxB2 by aspirin is  $948 \text{ pg / plts} \times 10^{-8}$ . Serum TxB2 levels higher than  $948 \text{ pg / plts} \times 10^{-8}$  indicate that aspirin does not completely inhibit thromboxane production. Serum TxB2 ELISA assay can identify aspirin resistance in about 50% of MPN patients. No relationship was recognized between clinical resistance and pharmacological resistance.

# INTRODUZIONE

## **Sindromi arteriose trombotiche acute e piastrine**

Le malattie cardiovascolari rappresentano la più comune causa di mortalità e morbilità nel mondo industrializzato. La maggior parte delle tromboembolie è causata dalla rottura di placche aterosclerotiche in cui vengono esposti gli elementi trombogenici del sub endotelio: le piastrine svolgono un ruolo chiave nella fisiopatologia dei disordini aterotrombotici, in virtù della loro capacità di aderire alle pareti del vaso danneggiato e stimolare la formazione di trombi. Una iper-attivazione del processo di aggregazione piastrinica, dunque, può favorire l'insorgenza di sindromi coronariche acute (ACS) e complicanze trombotiche, durante e dopo le procedure di rivascolarizzazione (Mason PJ et al, 2005).

Adesione e aggregazione piastrinica dipendono dalla presenza, a livello della membrana piastrinica, di specifiche molecole appartenenti alla superfamiglia delle integrine. In presenza di una lesione vascolare, l'esposizione del collagene e del fattore von Willebrand (vWF) innesca i fenomeni di adesione e aggregazione piastrinica attraverso il legame di queste proteine con i rispettivi recettori presenti sulla superficie piastrinica. Il processo di adesione inizia con il coinvolgimento della glicoproteina Ia/IIa (Gp Ia/IIa), recettore del collagene. In seguito, il legame del vWF al proprio recettore (complesso Gp Ib/V/IX) stabilizza l'adesione ed innesca il processo di attivazione piastrinica. Le piastrine iniziano quindi a liberare il contenuto dei loro granuli, riversando nel torrente circolatorio sostanze capaci di amplificare la risposta di aggregazione, quali ADP, calcio, serotonina, trombina e fibrinogeno. Il contatto di questi agonisti con i propri recettori attiva gli enzimi fosfolipasi C e fosfolipasi A2, situati sul lato citoplasmatico della membrana piastrinica. In particolare, l'enzima

fosfolipasi C amplifica lo stato di attivazione piastrinica attraverso un meccanismo a feedback positivo, e permette la fusione delle glicoproteine recettoriali IIb e IIIa che formano così il complesso attivo Gp IIb/IIIa (recettore del fibrinogeno), mentre l'enzima fosfolipasi A2, stimola la liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana (Lawrence FB et al, 2007). L'acido arachidonico sarà poi il substrato degli enzimi cicloossigenasi e trombossano sintetasi intrapiastrinici che lo trasformeranno in trombossano, il più potente agonista dell'aggregazione piastrinica rilasciato dalle piastrine stesse (Grosser T et al, 2007). Infatti il trombossano A2 (TxA2), interagendo con i propri recettori sulla superficie piastrinica, attiva la propria via di trasduzione stimolando l'enzima fosfolipasi C e quindi tutta la cascata di reazioni da esso dipendenti (Fig 1).

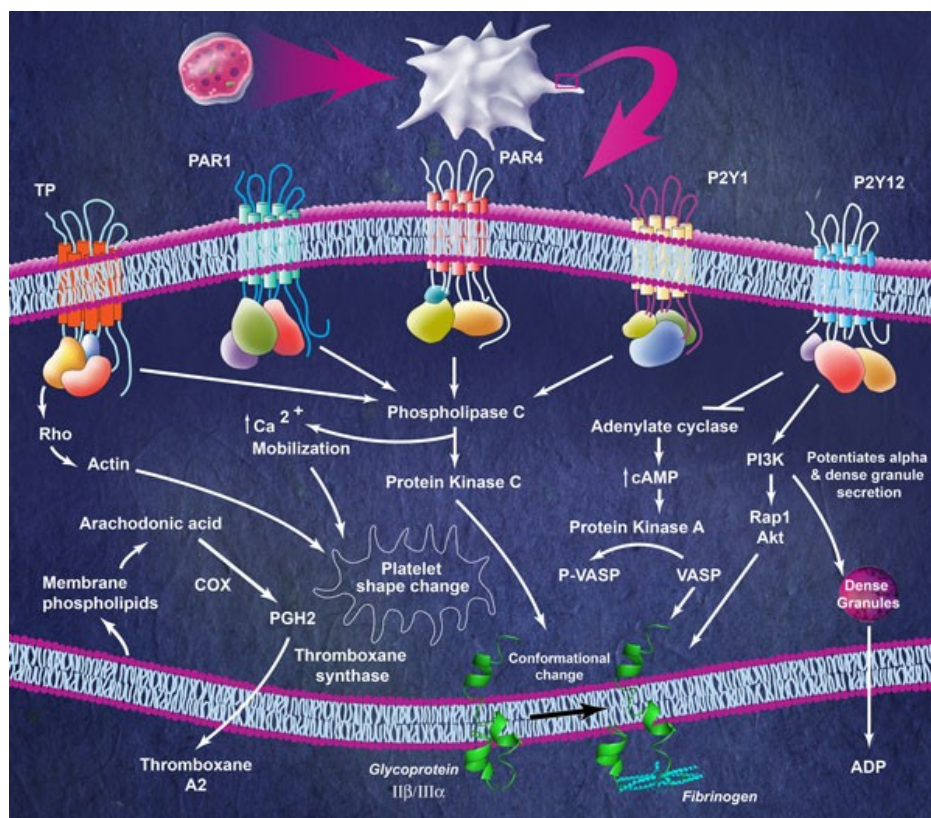


Fig 1 Le vie dell'attivazione piastrinica

Una volta attivate, le piastrine possono legarsi tra loro, grazie all'esposizione dei complessi GPIIb/IIIa che fanno da ponte tra piastrine adiacenti. I processi aterotrombotici possono essere visti come un'estensione patologica del normale processo emostatico, perciò un'adeguata inibizione farmacologica dell'aggregazione piastrinica risulta essere un presidio terapeutico fondamentale nei pazienti con sindromi coronariche.

Poiché l'aggregazione piastrinica contribuisce largamente allo sviluppo di eventi cardiovascolari, l'uso di farmaci antiaggreganti ha un importante ruolo nel trattamento delle malattie cardiovascolari: l'aspirina è la pietra miliare nella prevenzione primaria e secondaria degli eventi trombotici.

### **L'aspirina**

L'acido acetilsalicilico, o ASA, della famiglia dei salicilati, è un farmaco non steroideo (FANS) con potente azione antiaggregante, commercializzato per la prima volta nel 1899. Puro, a temperatura ambiente si presenta come un solido dai cristalli incolori; poco solubile in acqua (3 g/l), è molto solubile in etanolo.

Pur trattandosi di uno dei farmaci più importanti di questo ultimo secolo, l'acido salicilico veniva usato già dagli antichi Egizi che conoscevano gli effetti benefici delle piante (Vane JR et al, 1992). Erodoto, nelle *Storie*, narrava che esisteva un popolo stranamente più resistente di altri alle comuni malattie; tale popolo usava mangiare le foglie di salice. Anche Ippocrate era a conoscenza degli effetti analgesici e antipiretici che si potevano ottenere da estratti di salice e nel Medio Evo, i decotti ottenuti erano un rimedio antidolorifico popolare (Vane JR et al, 1992). La scoperta dell'acido acetilsalicilico, composto scarsamente presente in natura ma principalmente di sintesi, è dovuta ad un chimico francese. Per la prima volta, nel 1853, l'acido

acetilsalicilico venne isolato da Von Gerhardt miscelando acido salicilico con acido acetico (The Merck Index, 1996). Nel 1894, Felix Hoffmann, un farmacista della Bayer Company, decise di somministrare al padre l'acido acetilsalicilico per curare l'artrite reumatoide e, in seguito a questa scelta, vennero promossi formali trial clinici (Dresler H, 1974). Nel 1897, Hoffmann riuscì ad esterificare il gruppo fenolico (-OH) dell'acido salicilico con un gruppo acetile utilizzando anidride acetica, e formando l'acido *acetilsalicilico*, nonché acido acetico come sottoprodotto. Tale composto presentava gli stessi effetti terapeutici dell'acido salicilico, ma con minori effetti collaterali. Nel 1899 l'acido acetilsalicilico venne brevettato dalla Bayer con il nome di "Aspirin" da cui deriva il nome popolare riconosciuto in tutto il mondo. Inizialmente l'aspirina veniva usata come analgesico ed antipiretico, solo nel 1970 vennero riconosciute le proprietà antiinfiammatorie, anno in cui si ebbero più informazioni in merito al suo meccanismo d'azione.

### **Farmacologia dell'Aspirina**

L'aspirina, in condizioni alcaline, viene rapidamente idrolizzata al metabolita inattivo salicilato. Questo farmaco presenta quindi una bassa pKa, viene assorbito nello stomaco ed è presente nel sangue dopo 10 minuti dall'assunzione, con picco plasmatico di concentrazione dopo 30-40 minuti. L'aspirina è metabolizzata da esterasi nel sangue e nel fegato ed ha un'emivita di circa 20 minuti; la sua biodisponibilità è di circa il 50%, ma risulta inferiore in preparazioni a rilascio modificato (Cox D et al, 2006). Il principale metabolita, il salicilato, ha un'emivita di 3-6 ore a seconda della dose e può essere ricercato nel plasma e nelle urine molto tempo dopo che il farmaco attivo è stato eliminato. Data la sua instabilità, risulta complicato misurare l'aspirina in campioni biologici, soprattutto quando viene somministrata a bassi dosaggi. L'aspirina va ad agire

sulla via del TxA<sub>2</sub> inibendo irreversibilmente la cicloossigenasi-1 (COX-1), inattivando una sintetasi prostaglandinica e causando, di conseguenza, un irreversibile difetto nelle piastrine. La cicloossigenasi infatti esiste in 2 isoforme: COX-1, presente praticamente in tutte le cellule, e COX-2, la quale è prodotta costitutivamente nelle cellule dell'endotelio microvascolare (McAdam BF et al, 1999) e in risposta a stimolo infiammatorio (Smith WL et al, 1996). Nello specifico, l'aspirina acetila un residuo serinico dell'enzima nelle posizioni 529 (COX-1) e 516 (COX-2), a seconda dell'isoforma di COX (Fig 2).

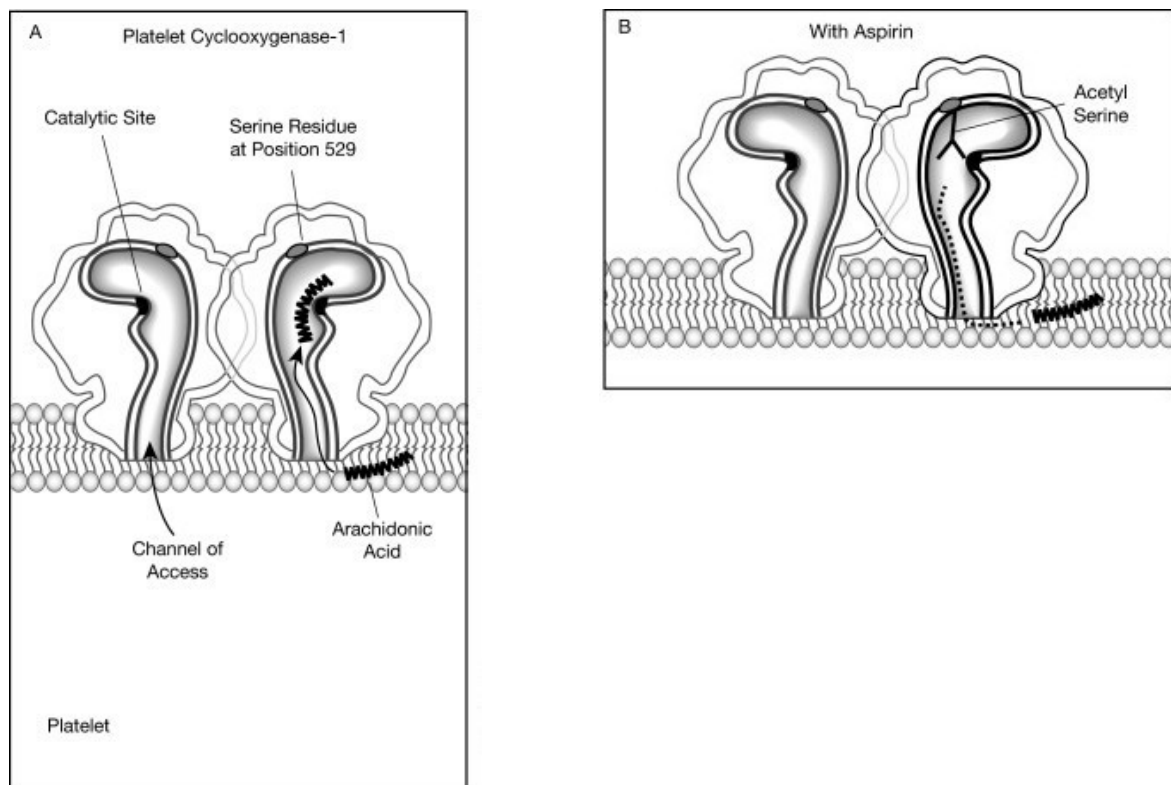


Fig 2 Struttura di COX-1 (A) e interazione con l'aspirina (B)

L'acetilazione della sintetasi prostaglandinica blocca il legame e i siti catalitici, inattivando effettivamente l'enzima COX-1; tutto ciò inibisce la sintesi delle prostaglandine al primo *rate-limiting step*, la conversione dell'acido arachidonico (AA)

in prostaglandina G<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, prevenendo, inoltre, la sintesi di ogni prostaglandina e trombossano prodotti dalla via (Cambria-Kiely JA et al, 2002) (Fig 3).

Le piastrine, essendo anucleate, non sono in grado di sintetizzare nuovo enzima; la perdita di uno di questi metaboliti, quale il TxA<sub>2</sub>, riduce drasticamente l'aggregabilità piastrinica.

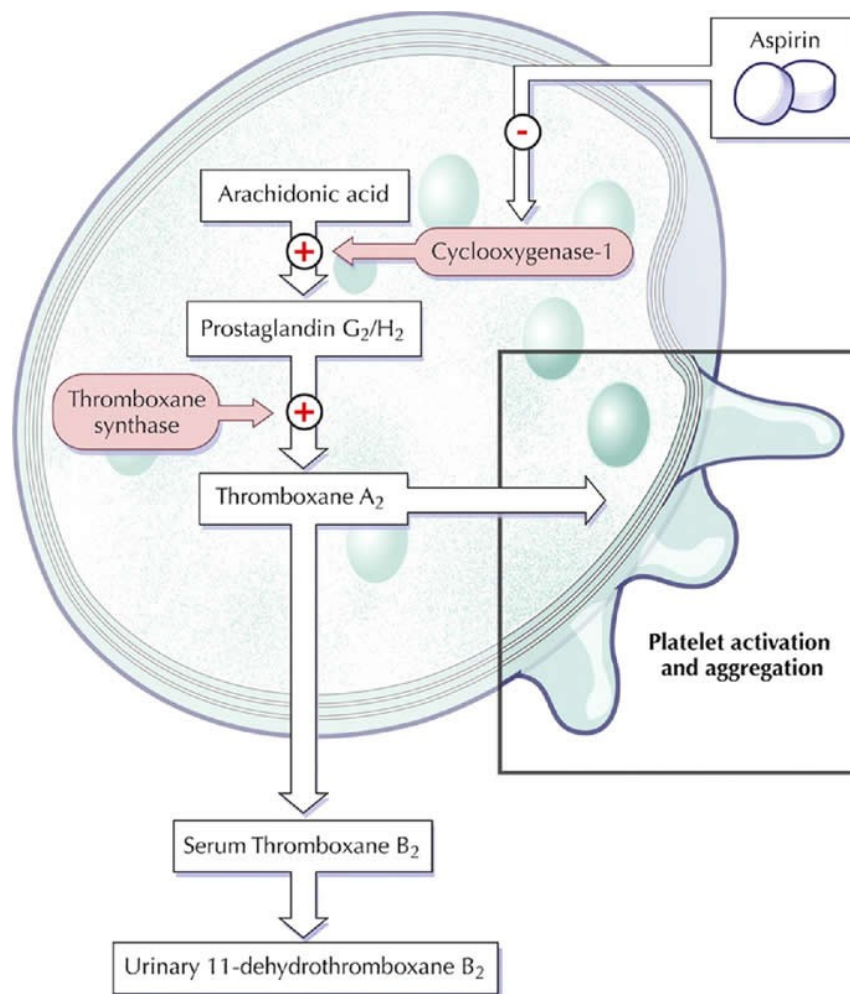


Fig. 3 Meccanismo d'azione dell'aspirina

### **Efficacia dell'aspirina**

A dispetto dei suoi 20 minuti di emivita, l'effetto antiplastrinico esercitato dall'aspirina necessita di una singola dose giornaliera di 100 mg e, poiché le piastrine mancano completamente della possibilità di sintetizzare nuova proteina, il blocco della

produzione di TxA2 permane per tutta la durata della vita piastrinica, ossia circa 10 giorni (Patrono C, 1994; Weksler BB et al, 1983). L'attività enzimatica di COX viene rinnovata del 10% al giorno come risultato del *turnover* piastrinico (Patrignani P et al, 1982; Awtry EH et al, 2000). Dosi giornaliere di aspirina di circa 100 mg ripetute risultano cumulative e così, dopo 10 giorni di somministrazione quotidiana, si arriva ad una soppressione maggiore del 95% a carico di COX (Patrignani P et al, 1982).

Tutti i farmaci mostrano variazioni nella risposta, ma ciò non sorprende se si valuta l'eterogeneità della popolazione; la motivazione principale è la variabilità farmacocinetica che riflette l'eterogeneità nel volume di distribuzione (peso, grasso) e/o il metabolismo del farmaco.

Per quanto riguarda l'aspirina, la risposta alla terapia può essere variabile e, nonostante siano sufficienti solo 30 mg per inattivare completamente COX-1 dopo una settimana, un'inibizione sufficiente si ottiene con una dose giornaliera di 80-160 mg (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). L'efficacia dell'aspirina a basse dosi nella prevenzione degli eventi cardiovascolari è stata ampiamente documentata; la somministrazione di aspirina in dosaggio compreso tra i 75 e i 325 mg al giorno fa diminuire la percentuale di infarti non fatali del miocardio da 35% a 18% (Ridker PM et al, 1991; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994) e diminuisce del 22% gli eventi cardiovascolari mortali (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002).

Tuttavia, non tutti i pazienti traggono beneficio dagli effetti antiplastrinici dell'aspirina allo stesso modo, poiché, nonostante il trattamento, può verificarsi una reattività persistente. Si stima che circa un quarto dei pazienti in trattamento con aspirina a basse dosi non beneficino dell'effetto antiplastrinico e vadano ugualmente incontro ad eventi cardiovascolari.

### **Definizione di Resistenza all'aspirina**

Il termine “resistenza” all'aspirina è stato usato per descrivere diversi fenomeni, inclusi l'incapacità dell'aspirina di proteggere i soggetti da complicanze trombotiche, di portare ad un allungamento del tempo di sanguinamento e di inibire la sintesi di TxA<sub>2</sub> o di produrre un effetto anticipato su uno o più test di funzionalità piastrinica *in vitro* (Krasopoulos G et al, 2008; Snoep JD et al, 2007; Wang TH et al, 2006).

Il termine “resistenza” dovrebbe essere usato quando un farmaco è incapace di colpire il suo target, a causa dell'incapacità di raggiungerlo (come conseguenza di una ridotta biodisponibilità, inattivazione *in vivo* o interazione negativa con altre sostanze) o a causa di alterazioni del target stesso (Cattaneo M, 2004). Più correttamente, quindi, il fatto che alcuni pazienti possano andare incontro ad eventi cardiovascolari ricorrenti nonostante la terapia a lungo termine con aspirina, dovrebbe essere chiamato “fallimento terapeutico”. In base a questa definizione utilizzata dai farmacologi, la resistenza all'aspirina dovrebbe descrivere solo quei casi in cui il farmaco è incapace di inibire la produzione di TxA<sub>2</sub> COX-1 dipendente.

Tuttavia, nei lavori scientifici, la definizione di resistenza all'aspirina è stata utilizzata per esprimere sia il fallimento clinico (resistenza clinica) (Bhatt D et al, 2003), che la resistenza documentata con test di laboratorio (resistenza farmacologica). Alcuni autori (Gum PA et al, 2001) hanno meglio parlato di “non-responsivi all'aspirina” per identificare i casi di mancata risposta clinica e di “resistenza” quando l'aspirina risulta incapace di inibire la produzione di TxA<sub>2</sub> o quando non è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica.

Vista la natura multifattoriale dell'aggregazione piastrinica, è plausibile che vi sia più di un meccanismo coinvolto nel fallimento della terapia con aspirina. Per quanto noto, la mancata risposta all'aspirina può essere attribuita a fattori clinici, cellulari e genetici

(Bhatt DL, 2004). Studi recenti (Hankey GJ et al, 2006) hanno mostrato che il 40% dei pazienti con malattie cardiovascolari non si attiene scrupolosamente al prescritto regime di terapia con aspirina: tale mancata compliance porta ad una scarsa efficacia della terapia e può indurre al sospetto di resistenza all'aspirina. Permane anche una certa incertezza sulla dose ottimale di utilizzo dell'aspirina: il dosaggio raccomandato attualmente è tra i 75 e i 100 mg al giorno in modo da massimizzare il beneficio e minimizzare i rischi gastro-enterici. L'effetto dell'aspirina, però, è influenzato da numerosi fattori che differiscono da paziente a paziente: la funzionalità epatica, e quindi l'aumentato metabolismo della stessa aspirina, può diminuirne la biodisponibilità; sembra anche che alcuni fattori genetici modifichino l'efficacia dei salicilati (Fitzgerald DJ, 2007). Inoltre, la risposta all'aspirina è differente da individuo ad individuo e il dosaggio probabilmente dovrebbe essere personalizzato.

E' stato segnalato che anche il fumo aumenta l'aggregazione piastrinica nonostante la terapia con aspirina (Ichiki K et al, 1996) e che l'assunzione contemporanea di FANS all'aspirina blocca l'accesso al sito di legame di COX-1 occupando un sito vicino, ed impedisce all'aspirina di acetilare la serina bersaglio (Sanderson S et al, 2005) (Fig 4). I FANS sono anche noti per inibire la produzione di prostaciclina COX-2 dipendente, che promuove la trombolisi nelle cellule microendoteliali. Queste relazioni antagonistiche limitano gli effetti cardioprotettivi dell'aspirina e potrebbero contribuire alla resistenza a questo farmaco.

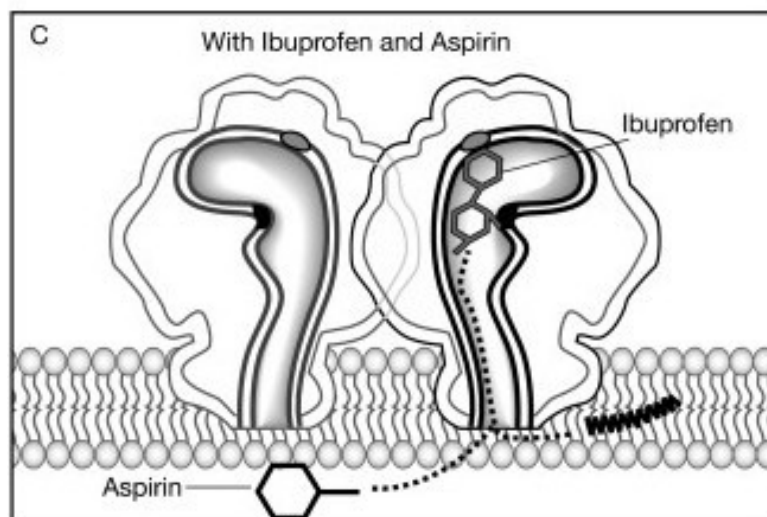


Fig 4 Interazione aspirina-ibuprofene.

I fattori cellulari che influenzano l'efficacia dell'aspirina includono un'inadeguata soppressione di COX-1 piastrinico e un'over espressione di mRNA di COX-2 da parte di piastrine e cellule endoteliali. La produzione di 8-iso-PF<sub>2</sub>α mediante perossidazione catalizzata dall'arachidonato potrebbe inoltre provocare resistenza all'aspirina per mezzo di un legame ai recettori del trombossano (Davi G et al, 2004).

Anche fattori genetici, quali i polimorfismi dell'enzima COX-1 o di recettori coinvolti nell'aggregazione piastrinica sono stati presi in considerazione come possibili cause di resistenza all'aspirina. Una mutazione puntiforme della glicoproteina IIIa (GPIIIa), chiamata HPA-1, è stata ritenuta un fattore di rischio per le sindromi coronariche acute: soggetti omozigoti per l'allele a presentano una leucina (L) in posizione 33 della GPIIIa matura, mentre i soggetti che portano l'allele raro b (25% della popolazione del Nord Europa con 2% di omozigoti) in quella posizione presentano una prolina (P). La variazione aminoacidica L33P è il risultato di una sostituzione di una citosina con una timidina in posizione 1565 dell'esone 2 del gene della GPIIIa (Newman PJ et al, 1989). Le piastrine che esprimono questa mutazione sembrano avere una soglia di attivazione molto più bassa delle altre e, in particolare rilasciano precocemente il contenuto degli α

granuli ed attivano la GP IIb/IIIa e il legame del fibrinogeno. I diversi genotipi HPA-1 rispondono diversamente all'aspirina: le piastrine dei soggetti eterozigoti infatti, risultano più sensibili al farmaco, se paragonate a quelle di soggetti omozigoti per l'allele raro b (Michelson AD et al, 2000). Si pensa che l'iperreattività che risulta dalla mutazione determini una formazione continua di trombi riducendo l'efficacia dell'aspirina (Macchi L et al, 2003; Cambria-Kiely JA et al, 2002; Undas A et al, 2001) (Fig. 5).

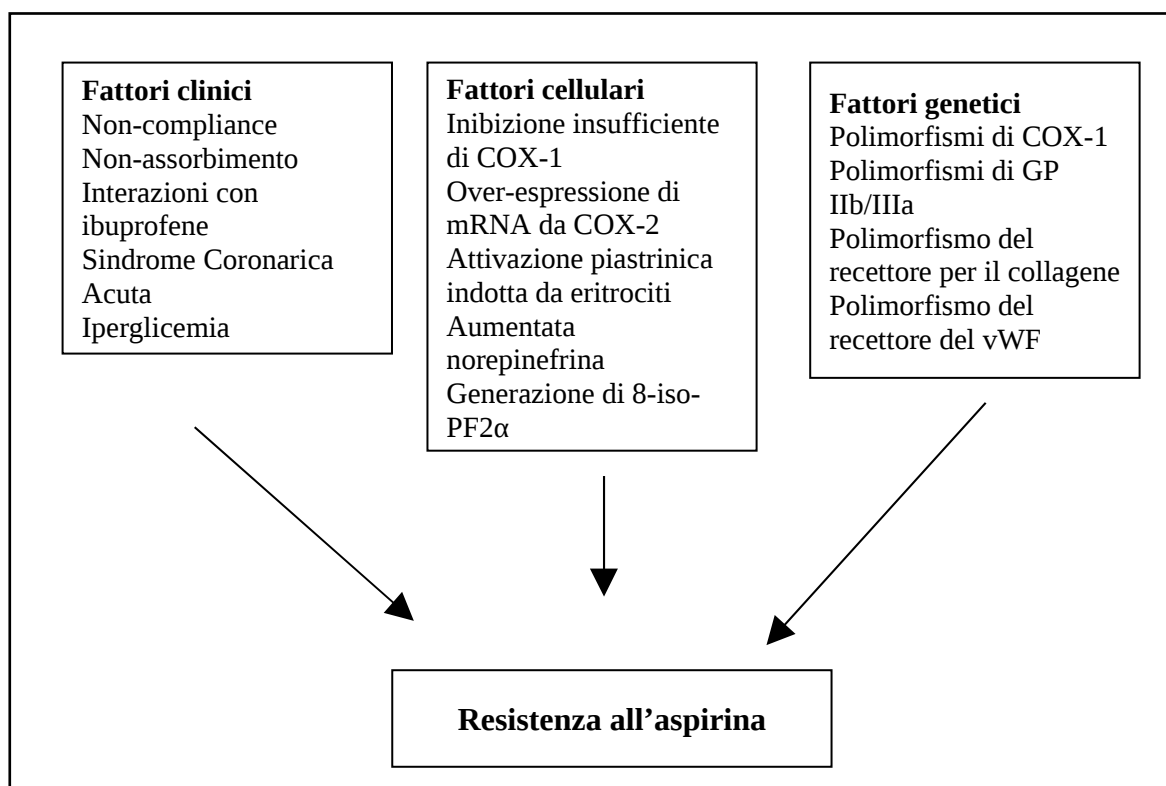


Fig 5 Presunte cause di resistenza all'aspirina

Tra le patologie che possono essere trattate con somministrazioni di aspirina si ritrovano anche le malattie mieloproliferative.

### Neoplasie Mieloproliferative

Le “Neoplasie mieloproliferative” (MPN) sono malattie ematologiche causate da abnorme proliferazione clonale della cellula staminale. La recente classificazione di

queste patologie, prodotta dalla World Health Organization (WHO) nel 2008 (Tefferi A et al, 2008), comprende le tre classiche malattie mieloproliferative croniche che non presentano la traslocazione del cromosoma Philadelphia (Ph-), e cioè la policitemia vera rubra (PV), la trombocitemia essenziale (ET) e la mielofibrosi primaria (PMF) nonché altre forme meno comuni e meno conosciute (Tab 1).

<b>Neoplasie mieloproliferative (MPN)</b>
• Leucemia Mieloide, Cronica (CML)
• Policitemia Vera (PV)
• Trombocitemia Essenziale (ET)
• Mielofibrosi Primitiva (PMF)
• Leucemia Neutrofila Cronica (CNL)
• Leucemia Eosinofila Cronica (CEL)
• Mastocitosi (MCD)
• MPN inclassificabili

Tab. 1 Classificazione delle Neoplasie Mieloproliferative

Le principali caratteristiche cliniche di PV, ET e PMF sono rispettivamente l'aumento del numero delle cellule di tutte e tre le linee, mieloide, eritroide e linfoide, ma soprattutto, dei globuli rossi nella PV, delle piastrine nella ET e la proliferazione dei fibroblasti con incremento della trama reticolinica nel midollo nella PMF. In comune, queste patologie hanno l'ipercellularità del midollo, la propensione alla trombosi e alle emorragie e il rischio a lungo termine di evoluzione in leucemia (Campbell PJ. et al, 2006). L'incidenza annuale delle singole MPN è di 1-3 casi per 100.000/abitanti per anno (Campbell PJ. et al, 2006).

### ***Biologia molecolare delle malattie mieloproliferative croniche***

Nel 2005, 5 diversi gruppi di ricercatori (Baxter EJ et al, 2005; James C et al, 2005; Kralovics R et al, 2005; Levine RL et al, 2005; Zhao R et al, 2005) hanno riportato la presenza di una mutazione puntiforme ed acquisita nel gene della Janus kinasi 2 (JAK2) nella maggior parte dei pazienti con MPN Ph-. JAK2 è una tirosin-kinasi citoplasmatica che ha un ruolo cruciale nella via di signaling intracellulare da parte di recettori per eritropoietina (EPOR), trombopoietina (MPL), interleuchina 3, fattore di crescita delle colonie granulocitarie (GM-CSF) (Sandberg EM et al, 2004; Kisseleva T et al, 2002). Quando l'agonista (ad esempio l'eritropoietina, EPO) si lega al suo recettore, si verifica una dimerizzazione nel recettore stesso (Remy I et al, 1999; Lu X et al, 2006; Seubert N et al, 2003) con conseguente fosforilazione ed attivazione di JAK2 (Witthuhn BA et al, 2003). La JAK2 attivata fosforila il dominio citoplasmatico dello stesso recettore, facilitando il *docking* di proteine effettrici e l'inizio delle cascate di segnali intracellulari (Sandberg EM et al, 2004; Kisseleva T et al, 2002); i suoi partner principali sono STAT (*signal transducers and activators of transcription*) 5 e 3 (Kaushansky K, 2005) (Fig 6).

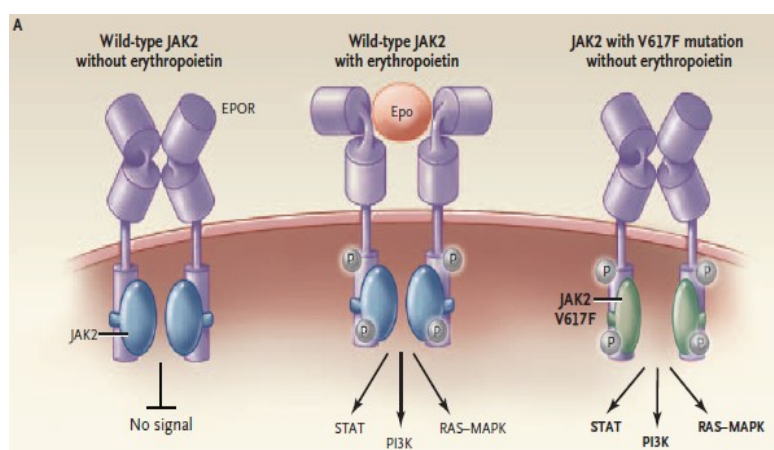


Fig 6 Ruolo di JAK2 nel pathway di signaling e legame dell'eritropoietina. (Modificato da Campbell PJ et al, 2006).

I topi JAK2 knock-out muoiono al dodicesimo giorno dello stato embrionale, per completa assenza di eritropoiesi (Neubauer H et al, 1998; Parganas E et al, 1998). I primi studi condotti sulla PV avevano dimostrato in alcuni pazienti la perdita di parti del cromosoma 9p (Najfield V et al, 2002) dove si trova il gene di JAK2, scelto quindi come gene candidato nella genesi delle MPN.

Virtualmente tutte le PV sono caratterizzate dalla presenza di mutazioni a carico di JAK2, alcune più comuni ed altre più rare. Il 90-95% dei casi con PV porta la mutazione V617F che sostituisce con una voluminosa fenilalanina una valina di piccole dimensioni in posizione 617 dell'esone 14 (V617F) (Baxter EJ et al, 2005; Levine RL et al, 2006). Il residuo 617 è localizzato nel dominio JH2, o pseudokinasico, che regola negativamente il dominio kinasico (Saharinen P et al, 2000). La mutazione V617F viene definita *gain-of-function mutation*, dato che la proteina JAK2 mutata viene inattivata in misura minore di quella wild-type (WT) e quindi trasduce più efficacemente il segnale indotto dal legame dei fattori di crescita ai loro specifici recettori, con una minore apoptosi delle cellule emopoietiche (Sandberg EM et al, 2004; Kisseleva T et al, 2002). Circa il 3% dei casi di PV porta mutazioni a carico dell'esone 12 dello stesso gene (Scott LM et al, 2007) che determinano modifiche di aminoacidi prossimi al sito di legame di JAK2 con il recettore dimerizzato delle citochine, causando quindi un'attivazione costitutiva della proteina.

Il 30% circa dei pazienti con PV risulta omozigote per la mutazione JAK2V617F in conseguenza ad una ricombinazione mitotica che coinvolge il cromosoma 9p (Kralovics R et al, 2005). Al contrario circa la metà dei casi di ET e PMF è caratterizzata dalla presenza della mutazione JAK2V617F e, nel caso delle ET, si trova raramente in forma omozigote (Vannucchi A, et al., 2007). Le ET JAK2 mutate hanno caratteristiche fenotipiche molto simili alle PV: comparate a quelle non mutate, presentano livelli di

emoglobina e di globuli bianchi più alti, un midollo più cellulare ed un'elevata responsività alla terapia con idrossiurea (Campbell PJ et al, 2005). E' oggi opinione corrente che le ET JAK2V617F siano delle forme fruste di PV (Wolanskyj AP et al, 2005) con un grado di eritrocitosi influenzato da altri fattori (bassi livelli di EPO, sesso ed eterozigosi per la mutazione V617F) (Campbell PJ et al, 2005).

Tra i pazienti che non presentano la mutazione, circa l'1% di quelli affetti da ET e il 5% di quelli affetti da PMF è caratterizzato dalla presenza di mutazioni in posizione 515 del gene di MPL; in particolare è descritta una sostituzione di un triptofano con una leucina (MPL-W515L), con una lisina (MPL-W515K) o con una alanina (MPL-W515A) (Skoda RC, 2009). I casi restanti a tutt'oggi non sono stati biologicamente chiariti. Tuttavia, le caratteristiche delle MPN quali splenomegalia, anomalie a livello citogenetico, displasia megacariocitaria, tendenza alla trasformazione in mielofibrosi o leucemia (Campbell PJ et al, 2005) ed ematopoiesi clonale (Levine RL et al, 2006; Antonioli E et al, 2005) sono simili nei casi mutati e in quelli WT.

## **Eventi trombotici nelle Malattie Mieloproliferative**

### ***Incidenza della Trombosi nelle MPNs***

Trombosi ed emorragie sono complicanze tipiche della PV e della ET. Per molti pazienti rappresentano il primo motivo di diagnosi della MPN mentre per altri si manifestano durante il decorso della malattia. Si stima che vi sia un'incidenza di trombosi pari al 11-25% nelle ET e del 12-39% nelle PV (Elliott MA et al, 2005) e, comunque, le trombosi, sia venose che arteriose, rappresentano la causa principale di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da ET e PV. Le trombosi arteriose più comuni sono quelle a carico del sistema circolatorio cerebrale (ictus o TIA), delle coronarie

(infarti o angine instabili), delle arterie degli arti; le trombosi venose interessano tanto le vene degli arti che le vene splancniche o cerebrali e possono associarsi o meno ad embolia polmonare. Sono comuni anche disturbi del microcircolo come eritromelalgia, parestesie, vertigini, amaurosi fugax, cefalea (Harrison CN, 2005).

### ***Patogenesi della Trombosi nelle MPNs***

Non è attualmente stato dimostrato che nelle MPN la presenza dei classici fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete, obesità e tabagismo) (Elliott MA et al, 2005; Barbui T et al, 2004) sia in relazione con le trombosi arteriose, e neppure è stato determinato con certezza che la coesistenza della MPN con fattori di rischio protrombotico acquisito (sindrome da anticorpi anti-fosfolipide) o ereditario (deficit di ATIII, prot C, prot S, fattore V Leiden, variante protrombinica ecc) sia collegabile alle trombosi venose riscontrate in questi soggetti (Harrison CN et al, 2005; Jensen MK et al, 2002). Un'età superiore a 60 anni e l'anamnesi positiva per precedenti episodi trombotici, sono i soli fattori di rischio ad oggi validati per le complicanze trombotiche (Cortelazzo S et al, 1990); tuttavia anche altri meccanismi sono stati presi in considerazione e sono in corso di valutazione. Mentre è stato chiarito che un numero molto elevato di piastrine ( $>1500 \times 10^9/L$ ) determina una forma acquisita di Malattia di von Willebrand e quindi gioca un ruolo importante nel determinare gli eventi emorragici (Federici AB et al, 2001; Buss DH et al, 1985; Bellucci S. et al, 1986; van Genderen PJ et al, 1994), non sembra esserci una correlazione tra entità della trombocitosi e rischio trombotico (Elliot MA, et al 2005; Landolfi R et al, 2007). Tuttavia, in pazienti ad alto rischio, abbassando la conta piastrinica a  $400 \times 10^9/l$ , si riduce l'incidenza di eventi trombotici (Regev A. et al, 1997; Storen E.C. et al, 2001). Nonostante ciò, non è chiaro se questo sia da attribuire ad una

riduzione della sola conta piastrinica o al complessivo effetto della mielosoppressione (Cortelazzo S. et al, 1990).

La relazione tra trombosi, ematocrito e parametri *in vivo* di viscosità del sangue e perfusione tissutale è complessa. IL principale responsabile *in vitro* della viscosità del sangue è l'ematocrito, tuttavia *in vivo* le dinamiche del flusso sanguigno nei vasi e l'ossigenazione nelle arterie giocano un ruolo molto importante (Pearson TC, 1997). *In vivo*, un aumentato livello di ematocrito è associato con una diminuzione del flusso cerebrale (Kassum & Thomas, 1977).

Il rischio di trombosi soprattutto in ambito arterioso, sembra aumentato nei pazienti con MPN con una conta di leucociti superiore a 10.000/microlitro. Elevate conte di leucociti alla diagnosi (Carobbio A et al, 2007) sono associate a elevato rischio trombotico, presumibilmente riconducibile all'attivazione delle piastrine da parte dei polimorfonucleati (Falanga A et al, 2000; Falanga A et al, 2007). Inoltre, è stato suggerito che la mutazione JAK2V617F possa alterare il signaling a valle delle molecole di adesione sui globuli rossi e bianchi e, di conseguenza, promuovere l'adesività tra cellule, favorendo così l'evento trombotico (Wautier MP et al, 2007).

In uno studio prospettico di 776 pazienti con ET, Campbell et al, (2005) hanno dimostrato un aumentato rischio di trombo-embolismo venoso nei pazienti portatori della mutazione JAK2V617F rispetto ai pazienti WT. Anche in un'analisi retrospettiva del 2007 (Vannucchi A et al, 2007) che ha preso in considerazione pazienti con MPN, gli eventi trombotici nei pazienti ET, omozigoti per la mutazione di JAK2, sono risultati più frequenti rispetto ai pazienti eterozigoti e a quelli WT, sia prima della diagnosi che durante il follow-up.

## Trattamento delle MPNs

I casi di ET e PV ad alto rischio (età maggiore di 60 anni e/o precedenti eventi trombotici, o piastrine  $> 1500 \times 10^9/L$ ) richiedono terapia citoriduttiva allo scopo di controllare il numero di globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. I pazienti “low-risk” se affetti da PV vengono trattati con salassi e basse dosi di aspirina (Finazzi G et al, 2007). Infatti, lo studio ECLAP (Landolfi R. et al, 2004) ha dimostrato che la somministrazione di basse dosi di aspirina (100mg/die) riduce in maniera significativa il rischio di trombosi arteriose nei pazienti con PV che non hanno controindicazioni all’uso del farmaco. L’efficacia dell’aspirina è giustificata dal dimostrato aumento della sintesi di trombossano che si riscontra nei pazienti con PV (Landolfi R et al, 1992) e 100 mg/die di ASA sono sufficienti a bloccare completamente la produzione di trombossano piastrinica nei pazienti affetti da PV.

Nonostante la mancanza di trial controllati che formalmente dimostrino l’efficacia e la sicurezza dell’aspirina nei pazienti con ET, per assonanza con i dati prodotti dall’ECLAP, basse dosi di aspirina vengono utilizzate abitualmente anche in questi pazienti (Vannucchi A, et al, 2009, Campbell P et al, 2005; Birgegard G, 2009; Barbui T et al 2004; Tefferi A et al, 2009) sia in prevenzione primaria che secondaria. I pazienti affetti da ET possono dunque essere avviati ad un programma di *wait and watch* salvo aggiungere aspirina in caso di presenza di cofattori di rischio aterogeno (Barbui T. et al, 2004).

Lo scopo principale del nostro studio è stato valutare l'effettiva presenza della “resistenza all'aspirina” nei pazienti affetti da MPN.

Inoltre abbiamo cercato di capire:

- se esistono cause genetiche che possano correlare con la “resistenza all'aspirina” (presenza della mutazione JAK2V617 e dell'allele raro b di HPA-1);
- quali sino i test di laboratorio più atti a riconoscere la non-responsività all'aspirina di un paziente con MPN (aggregazione piastrinica con acido arachidonico e dosaggio del trombossano sierico);
- se sia possibile correlare i risultati ottenuti nei test di laboratorio con le caratteristiche cliniche dei pazienti.



## PAZIENTI

Sono stati studiati 83 pazienti (30/53 M/F, 62±15 anni, follow-up mediano 7.1 anni) che afferivano alla U.O.C. di Medicina Interna CLOPD, Azienda Ospedaliera – Università di Padova, affetti da MPN. Trentadue pazienti (16/16 M/F, 64±12 anni) erano affetti da Policitemia Vera (PV) e 51 (14/37 M/F, 58±15 anni) da Trombocitemia Essenziale (ET), diagnosticate in accordo con i criteri della World Health Organization (WHO). Tali pazienti erano tutti in terapia con aspirina a basse dosi (100 mg/die) (Cardioaspirin®, Bayer) (MPN in ASA). Trentadue pazienti erano in terapia antiaggregante perché affetti da PV; tra questi 9 avevano sofferto di complicanze trombotiche prima della diagnosi. Tra i casi di ET, 44 erano stati avviati a trattamento antiaggregante perché maggiori di 60 anni e 7 perché avevano presentato un evento trombotico. Le 16 complicanze tromboemboliche (12/4 arteriose/venose) erano 6 TIA, 4 IMA, 1 Angina pectoris, e 1 tromboembolia all'arto inferiore e 4 TVP (tabella 2, da PD1 a PD16).

	<b>Diagnosi PV/ET</b>	<b>Sede trombosi A/V</b>	<b>WBC x10<sup>9</sup>/L</b>	<b>HCT %</b>	<b>Plts x 10<sup>9</sup>/L</b>	<b>Fattori di rischio</b>
<b>PD1</b>	PV	A	8.3	40	800	Ipertensione
<b>PD2</b>	ET	V	6.4	37	1000	no
<b>PD3</b>	PV	A	11.3	48	391	Ipertensione/ dislipidemia
<b>PD4</b>	PV	A	8.1	52	230	Ipertensione
<b>PD5</b>	ET	A	4.8	40.3	622	no
<b>PD6</b>	PV	A	11	50	270	no
<b>PD7</b>	PV	A	8.9	49	670	Ipertensione/ dislipidemia

<b>PD8</b>	PV	V	8.6	39	800	no
<b>PD9</b>	PV	A	10	52	392	fumo
<b>PD10</b>	PV	A	10.1	45	860	ipertensione
<b>PD11</b>	ET	A	7.9	52	260	no
<b>PD12</b>	PV	A	12.3	52	513	no
<b>PD13</b>	ET	V	9.1	51	890	ipertensione
<b>PD14</b>	ET	V	7.7	36	694	Fumo/diabete/ipertensione
<b>PD15</b>	ET	A	8.2	44	625	fumo
<b>PD16</b>	ET	A	9.2	38	720	Fumo/ipertensione
<b>PD17</b>	PV	A	8.6	40	813	Fumo/obesità/ipertensione/ dislipidemia
<b>PD18</b>	PV	A	9.5	41	148	Fumo/dislipidemia
<b>PD19</b>	PV	A	10	49	532	Ipertensione/ dislipidemia
<b>PD20</b>	ET	A	4.9	41	542	no
<b>PD21</b>	ET	A	6.3	36	1030	Ipertensione
<b>PD22</b>	ET	A	7.6	38	550	no
<b>PD23</b>	ET	A	8.5	50	818	no
<b>PD24</b>	PV	A	10.2	51	412	no
<b>PD25</b>	ET	A	7.7	51	432	no
<b>TOTALE</b>	13PV/ 12ET	21A/ 4V	12.5 ± 3.3	44,2 ± 6	600.6 ± 244.3	11 no/15 sì

Tabella 2: Caratteristiche cliniche dei pazienti con evento trombotico. I valori emocromocitometrici sono quelli al momento dello studio

Tra gli 83 pazienti MPN in ASA, 17 eseguivano salassi per mantenere l'ematocrito <45%, 45 erano in terapia con idrossiurea e 3 avevano ricevuto anche busulfano, 2

erano in trattamento con anagrelide e 27 non avevano mai ricevuto terapie aggiuntive all'aspirina.

Sono stati studiati prima dell'avvio della terapia, anche 40 pazienti (21/19 M/F, 59±16 anni) (MPN basali) al momento della diagnosi avvenuta in 5 casi per IMA e in 4 per TIA (tab2. Da PD17 a PD 5). Nove (7/2 M/F, 60±16 età media) erano affetti da PV e 31 (14/17 M/F, 61±18 età media) da ET. Ventidue di loro (12/10 M/F, 59±36 anni) sono stati ristudiati dopo almeno 3 mesi di terapia con ASA 100 mg/die.

I principali valori emocromocitometrici dei pazienti con MPN al momento del nostro studio sono riportati nella tabella 3.

	<b>ET</b>	<b>PV</b>
<b>WBC x 10<sup>9</sup>/L</b>	6,85 ± 1,98	10,19 ± 4,47
<b>RBC x 10<sup>12</sup>/L</b>	4,18 ± 0,84	5,54 ± 0,82
<b>HGB g/dL</b>	12,93 ± 1,92	13,82 ± 1,21
<b>HCT %</b>	37,56 ± 5,7	42,38 ± 3,22
<b>PLTs x 10<sup>9</sup>/L</b>	664 ± 242	487 ± 188

Tabella 3: I principali valori emocromocitometrici dei pazienti con MPN da noi studiati

I nostri controlli sono stati 50 pazienti (18/32 M/F, 74±11 anni, 236 ± 90 piastrine x 10<sup>9</sup>/L) in terapia con aspirina da almeno 3 mesi, per prevenzione secondaria di eventi cardiovascolari (Controlli in ASA) e 42 soggetti sani non trattati (28/14 M/F, 46±10 anni, 229 ± 73 piastrine x 10<sup>9</sup>/L) (Controlli) tutti degenti nel nostro reparto.

Inoltre, per lo studio della frequenza del polimorfismo HPA-1 sono stati utilizzati 200 donatori di sangue, forniti dal Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Padova, residenti nel Triveneto Italia , appartenenti a diversi gruppi sanguigni. Le frequenze ottenute per il polimorfismo HPA-1 sono state confrontate con quelle fornite dalla letteratura per la popolazione italiana (Bontadini A et al, 2000).



## MATERIALI E METODI

### **Preparazione del DNA (separazione dei granulociti ed estrazione)**

Il DNA utilizzato per gli studi di biologia molecolare è stato estratto da granulociti neutrofili.

Per la preparazione delle cellule da sangue venoso periferico è stata effettuata una separazione cellulare in gradiente. Il sangue dei pazienti, anticoagulato 1:10 con sodio citrato 3,8%, è stato stratificato in provette da 15 ml contenenti un uguale volume di Histopaque-1007 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Dopo centrifugazione a 400g per 30' senza freno, il campione risulta così suddiviso:

surnatante con plasma e piastrine;

anello opaco di linfomonociti;

strato di soluzione di separazione per gradiente (Histopaque);

fondello di globuli rossi e polimorfonucleati.

Il fondello di globuli rossi e polimorfonucleati è stato lavato almeno due volte con una soluzione di Tris 20mM, EDTA 5mM a pH 8 per indurre la lisi degli eritrociti. Ogni lavaggio consiste in un'incubazione di 10 minuti a 4°C e successiva centrifugazione a 2000g per 15 minuti; il surnatante, che contiene i globuli rossi lisati, viene scartato e si conserva invece il pellet cellulare. Dopo l'ultimo lavaggio, il pellet è risospeso in soluzione fisiologica e conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione.

L'estrazione del DNA è stata eseguita con metodica semi-automatizzata mediante l'utilizzo dell'estrattore di DNA "Maxwell® 16 Instrument" della ditta Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Il funzionamento di questo estrattore si basa sull'adsorbimento selettivo del DNA da parte di una resina che riveste particelle paramagnetiche (MagneSil® Paramagnetic Particles -PMP's).

Vengono utilizzate apposite cartucce (Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit), suddivise in 7 pozzetti contenenti i reagenti predistribuiti. La sospensione cellulare (400µl) viene caricata nel primo pozzetto, contenente il buffer di lisi; nel secondo pozzetto sono invece presenti le particelle magnetiche. L'estrattore utilizza un pistone magnetico per lisare le cellule e trasferire le particelle magnetiche dal primo pozzetto, per l'adsorbimento del DNA, agli altri pozzetti, per effettuare una serie di lavaggi ed eliminare progressivamente tutte le impurità contenute nel campione.

Nella fase finale della corsa il DNA estratto viene liberato dalle particelle per immersione del pistone in 300 µl di un buffer apposito fornito assieme alle cartucce nel kit di purificazione. Il campione così ottenuto è già pronto per essere utilizzato nelle fasi successive dello studio.

### **Ricerca della mutazione somatica JAK2V617F**

Per l'identificazione della mutazione JAK2 V617F, tra le varie tecniche proposte, è stata scelta la PCR (Polymerase Chain Reaction) allele specifica (ASPCR) che garantisce una buona sensibilità grazie all'utilizzo di primers specifici per l'allele mutato.

I primers utilizzati sono della ditta Sigma (Sigma Aldrich):

JAK2 - F: 5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA – 3' (forward comune)

JAK2 - R: 5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT – 3' (reverse di controllo)

JAK2 - R2: 5'-TTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA– 3' (reverse specifico)

(Passamonti F et al., 2006)

Il primer JAK2-R2 è specifico per l'allele mutato poiché tale allele presenta una T al posto di una G in 3'; inoltre, per aumentare la specificità di questo primer, è stato inserito un mismatch intenzionale (G>A) al terzo nucleotide dal termine 3'. Con il primer JAK2-R2, JAK2-F consente di ottenere un amplificato di 282 paia di basi (bp) solo nei pazienti portatori della mutazione. Il primer JAK2-R corrisponde invece ad una sequenza nucleotidica più a valle della mutazione V617F e, con il primer JAK2-F, amplifica sia l'allele mutato che il wild-type (amplificato di 458 bp): è pertanto utilizzato per un controllo interno di corretto svolgimento della PCR.

Per la miscela di reazione vengono utilizzati: Go Taq Green Master Mix Promega 2X (contenente Taq polimerasi in appropriato buffer, dNTPs e MgCl<sub>2</sub> e Blu di Bromo Fenolo, Xilene Cianolo e Orange Dye), DNA di granulociti e i primer specifici. Denaturazione, appaiamento ed estensione vengono ripetuti per 40 cicli su termociclatore GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA).

#### Condizioni PCR

<b>Componenti</b>	<b>Conc. Iniziale</b>	<b>Volumi (µl)</b>	<b>Conc. Finale</b>
PCR Green Master Mix (Promega Corp.)	2 X	6,25	1 X
primer For	10 µM	1	0,8 µM
primer Rev specifico	10 µM	1	0,8 µM
primer Rev controllo	10 µM	1	0,8 µM
DNA	20 ng/µl	2	40 ng totali
H <sub>2</sub> O		1,25	fino a 12,5 µl

#### Programma PCR

<b>1 Hold</b>	<b>3 T° x 40 cicli</b>			<b>2 Hold</b>	
95°C	95°C	58°C	74°C	74°C	4°C
3 min	40 sec	40 sec	40 sec	5 min	

Al termine della reazione, gli amplificati vengono analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5%, in TBE 1X (Tris 89.2 mM, acido borico 89 mM, EDTA 2.5mM) con etidio bromuro: la presenza della banda di 282 bp oltre alla banda di controllo (458 bp), identifica il paziente portatore della mutazione.

Allo scopo di controllare che la PCR sia avvenuta in condizioni ottimali senza falsi positivi o falsi negativi, in ogni amplificazione, oltre ai campioni oggetto di studio, sono stati sempre analizzati anche un “controllo positivo” (DNA di un paziente omozigote per la mutazione) e un “controllo negativo” (DNA di un soggetto non mutato). La verifica della presenza o assenza della mutazione nei due controlli è avvenuta tramite sequenziamento.

### **Ricerca del Polimorfismo L33P di GpIIIa (HPA-1)**

L'analisi di questo polimorfismo prevede un'amplificazione con Real time PCR. Tramite questa tecnica è possibile amplificare e marcare selettivamente i due alleli del gene (allele a con la leucina e b con la prolina), grazie all'uso di due sonde specifiche (Taqman) per la base variabile (A>G) legate a due fluorofori diversi (FAM e VIC). L'amplificazione e il conseguente sviluppo di fluorescenza sono monitorati in tempo reale con l'uso dello strumento Real Time-PCR 7900 ditta Applied Biosystem. Per il test sono state utilizzate le soluzioni fornite dalla ditta Applied Biosystem per l'uso dello strumento. In tutte le reazioni di PCR sono stati inseriti anche in questo caso, oltre a un controllo negativo, tre controlli positivi (a/a; a/b; b/b) precedentemente testati con sequenziamento automatico. I risultati per la presenza/assenza dei due alleli nel campione di DNA in analisi sono forniti direttamente dallo strumento tramite il software SDS 2.3 (Applied Biosystem).

### Condizioni PCR

<b>Componenti</b>	<b>Conc. Iniziale</b>	<b>Volumi (µl)</b>	<b>Conc. Finale</b>
TaqMan M.M	2X	12,5	1 X
primer For	10 µM	2,25	900 nM
primer Rev	10 µM	2,25	900 nM
FAM	10 µM	0,325	130 nM
VIC	10 µM	0,5	200 nM
DNA	30 ng/µl circa	2	60 ng totali
H <sub>2</sub> O		5,175	fino a 25 µl

### Programma PCR Real Time

Fase 1: Absolute Quantification

<b>2Hold</b>	<b>2 T° x 45 cicli</b>			
50°C	94°C	94°C	60°C	4°C
2 min	7min	15 sec	1 min	

Fase 2: Discriminazione allelica post amplificazione

Sequenza prime e sonde, individuati utilizzando il software: SNP500cancer presente on-line nel sito del National Cancer Institute- Cancer Genome AnatomyProject  
(<http://snp500cancer.nci.nih.gov>)

FAM = Allele a = Leucina (T) 5' TGAGCCCAGAGGCA

VIC = Allele b = Prolina (C) 5'TGAGCCCGGAGGCA

PRIMER FOR TCTCTTTGGGCTCCTGTCTTACA

PRIMER REV GCAGATTCTCCTTCAGGTCACA

**Prelievo venoso e preparazione del Plasma Ricco di Piastrine (PRP), del siero e del plasma povero di piastrine (PPP)**

I campioni di sangue venoso periferico sono stati raccolti dai pazienti e da volontari sani dopo consenso informato. Il sangue è stato raccolto in Na Citrato 3,8%, 1:9 v/v, per ottenere il plasma o il PRP. Per ottenere il siero il sangue è stato raccolto direttamente in provetta di vetro in presenza di attivatori della coagulazione. Per l'ottenimento del PRP, il sangue è stato centrifugato a 180 x g senza freno per 10 minuti a temperatura ambiente entro 30 minuti dalla raccolta; per il siero e il PPP invece, le provette sono state centrifugate a 1050 x g per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette pulite adeguate all'analisi.

### **Aggregazione piastrinica con metodo di Born (LTA)**

L'aggregazione piastrinica è stata simulata usando un aggregometro Lumi-dual chronolog corporation (Fig. 7) (Mascia Brunelli s.p.a.-Biolife Italiana s.r.l., Milano, Italia) e seguendo la metodica suggerita da Born nel 1962 (Born GVR, 1962). Come agonista dell'aggregazione è stato utilizzato acido arachidonico (AA) (Sigma-Aldrich) in concentrazione finale (in PRP) 1mM. Il PRP, posto in apposite cuvette di vetro, è stato inizialmente pre-incubato a 37°C per 2 minuti e dopo l'aggiunta dell'agonista è stato monitorato per 4 minuti, mantenendolo in costante agitazione mediante piccoli magneti ricoperti in teflon. Le curve di aggregazione sono state registrate mediante un registratore Rec 112 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). L'aggregazione piastrinica è stata espressa come la percentuale massima di cambiamento nella trasmittanza luminosa rispetto alla linea di base, usando il plasma povero di piastrine come riferimento. I campioni dei pazienti in aspirina che mostravano un'aggregazione piastrinica >10% dopo la stimolazione con AA 1 mM sono stati considerati resistenti all'aspirina in accordo con la letteratura (Pulcinelli FM et al, 2004). Per ogni campione è stata valutata la possibilità di un'aggregazione spontanea. Per valutare che ogni

campione in esame avesse una funzionalità piastrinica normale, sono stati aggiunti 12,5  $\mu$ l di indometacina e 100 $\mu$ l di ACD (citrato acido destrosio) in modo da stimolare una, anche se pur minima, aggregazione.

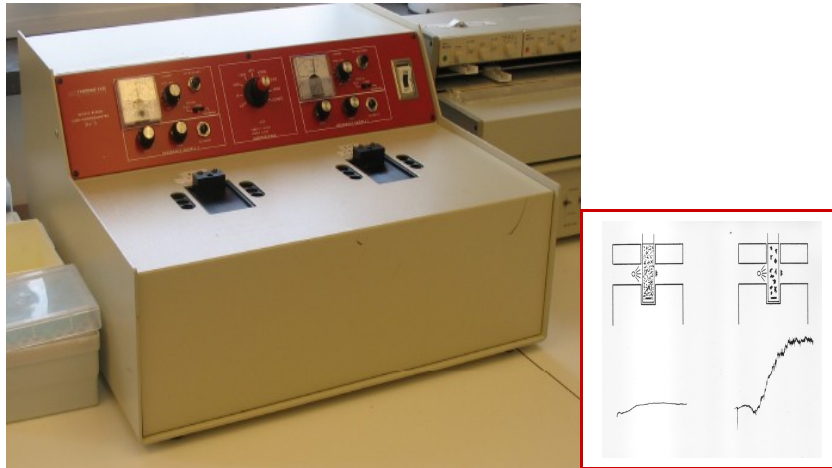


Fig. 7 Aggregometro Lumi-dual chronolog Corporation

### **Determinazione del Trombossano B2 (TxB2)**

Il TxB2, metabolita stabile del Trombossano A2, è stato misurato sul siero di pazienti in trattamento con aspirina, mediante un kit commerciale EIA (Thromboxane B2 Express EIA kit-monoclonal, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI; USA) seguendo i protocolli indicati dal produttore. Tutti i campioni sono stati testati in doppio e quelli che mostravano valori che si discostavano di molto dalla curva standard sono stati appropriatamente diluiti e ri-testati. I pozzetti della piastra fornita dal kit erano pre-coattati con un anticorpo monoclonale Anti-mouse IgG di capra e saturati con un composto proteico. Assieme allo standard o al campione da dosare è stato incubato un anticorpo monoclonale in concentrazione limitante e del TxB2 coniugato con acetilcolinesterasi (TxB2 tracer). Questo saggio è basato sulla competizione tra TxB2

(contenuto nel campione da testare) e il TxB2 (TxB2 tracer) aggiunto durante la procedura (Fig 8). Poiché la concentrazione di TxB2 tracer veniva mantenuta costante mentre quella del TxB2 libero poteva variare, la quantità di TxB2 tracer in grado di legarsi all'anticorpo era inversamente proporzionale alla concentrazione di TxB2 nel pozzetto. Questo complesso di TxB2 (libero o tracer) si legava all'anticorpo policlonale anti- mouse IgG. Dopo ripetuti lavaggi al fine di eliminare quanto in eccesso, veniva aggiunto il Reagente di Ellman (che contiene un substrato per l'Acetilcolinesterasi); il prodotto di questa reazione enzimatica mostrava un acceso colore giallo e assorbiva marcatamente a 412 nm. L'intensità del colore, determinata spettrofotometricamente, era proporzionale alla quantità di TxB2 tracer legato al pozzetto, la quale era inversamente proporzionale alla quantità di TxB2 libero presente nel pozzetto durante l'incubazione:

### Assorbanza $\alpha$ (Legame TxB2 Tracer)/ $\alpha$ 1/(TxB2)

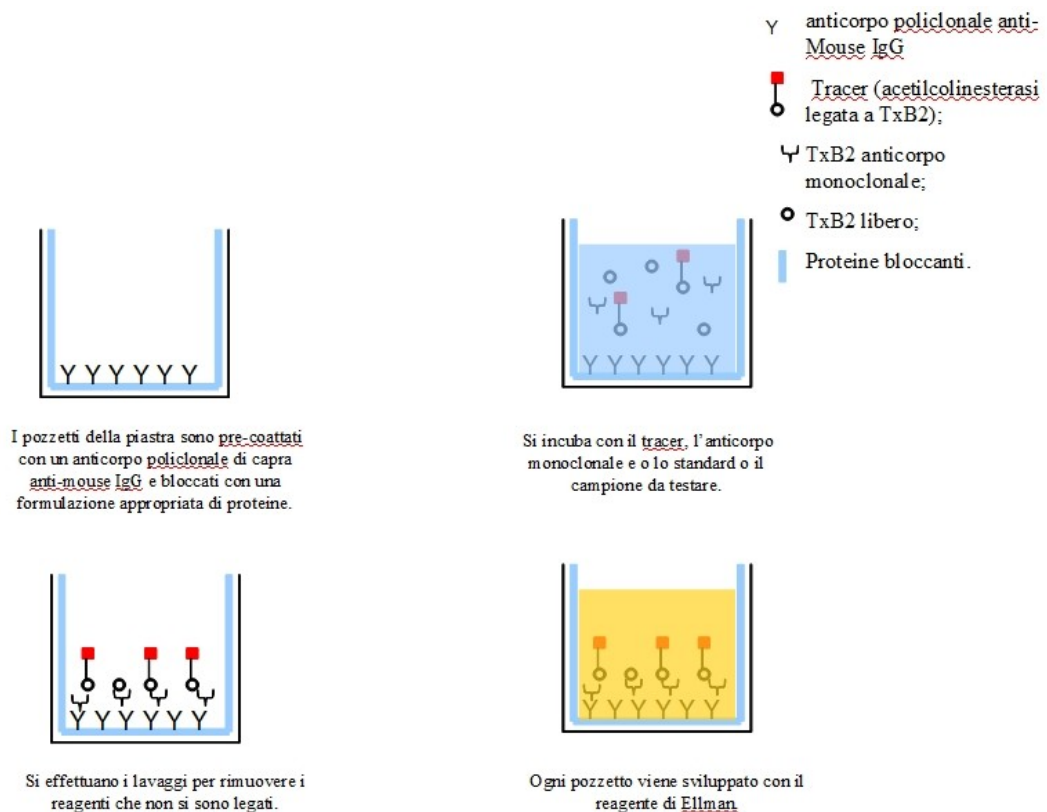


Fig. 8 Schema del dosaggio TxB2 EIA

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica delle frequenze dei diversi genotipi e alleli è stata effettuata mediante uso del software Graph Pad Prism5. Per lo studio dell'associazione tra la frequenza di un genotipo o un allele e il gruppo di pazienti è stato utilizzato il test  $\chi^2$  (chi-quadrato) o quello di Fisher. La curva ROC è stata determinata mediante lo stesso software e il valore del cut-off è stato designato in base all'analisi dei dati di specificità e sensibilità. La soglia di significatività statistica utilizzata era  $p < 0.05$ .



# RISULTATI

## STUDIO GENETICO

### Ricerca della mutazione JAK2V617F

La mutazione JAK2V617F è stata trovata in 37 (90.1%) affetti da PV e in 62 affetti da ET (75.6%) (Fig 9).

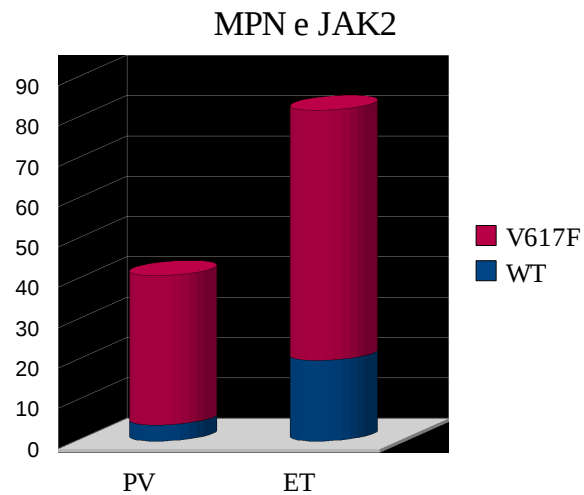


Fig 9 Incidenza della mutazione JAK2V617F nei nostri pazienti con MPN

Tra i 25 MPN (20.3%) che hanno sviluppato trombosi, 12 PV e 11 ET erano portatori della mutazione JAK2V617F (Fig. 10).

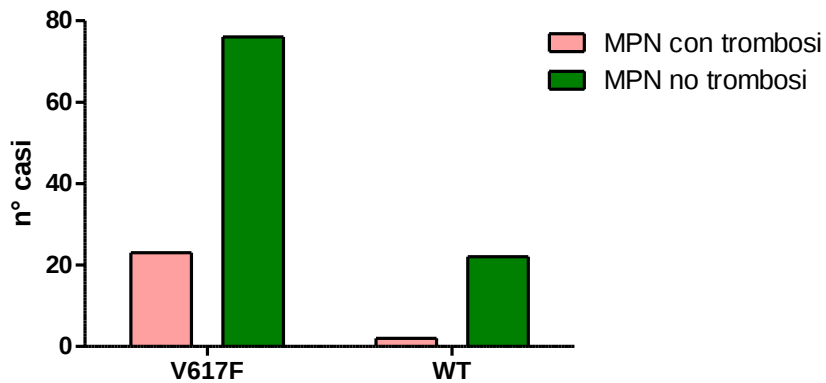


Fig 10 Correlazione tra eventi trombotici e mutazione JAK2V617F. L'incidenza di complicanze trombotiche è risultata statisticamente comparabile tra casi mutati e non-mutati.

L'incidenza di complicanze trombotiche non è stata diversa tra i pazienti MPN mutati e WT (p=ns) (Tab 4)

N° pazienti		PV	ET	TOT
		41	82	123
<b>Trombosi</b>	V617F	12 (29%)	11 (13.4%)	23 (18.7%)
	WT	1 (2.5%)	1 (1.2%)	2 (1.6%)
<b>Non trombosi</b>	V617F	25 (61%)	51 (62.2%)	76 (61.8%)
	WT	3 (7.5%)	19 (23.2%)	22 (17.9%)

Tab 4: Mutazione JAK2V617F ed eventi trombotici nei pazienti con neoplasie mieloproliferative (MPN)  
PV= policitemia vera ET= trombocitemia essenziale

### Polimorfismo HPA-1

Il polimorfismo HPA-1 è stato studiato in 32 MPN (5 PV e 27 ET) in condizioni basali e in 78 (29 PV e 49 ET) in terapia con aspirina. In particolare il polimorfismo è stato ricercato in tutti i 25 casi complicati da eventi trombotici (Tab 5).

N° pazienti		PV	ET	TOT
		34	76	110
<b>Trombosi</b>	a/a	8 (61.3%)	11 (78.6%)	19 (17.3%)
	a/b + b/b	5 (38.7%)	1 + 2 (7.1% +14.3%)	8 (7.3%)
<b>Non trombosi</b>	a/a	16 (76.2%)	39 (65%)	55 (50%)
	a/b o b/b	5 (23.8%)	21 (35%)	26 (23.6%)

Tab 5: Relazione tra eventi trombotici e polimorfismo HPA-1 nei pazienti con MPN

Il polimorfismo HPA-1 non è risultato statisticamente più frequente tra gli MPN che hanno sviluppato trombosi rispetto a quelli senza eventi trombotici (p=ns).

Non è stato riconosciuto uno specifico profilo molecolare che correli con le complicanze trombotiche (Tab 6).

	<b>Trombosi</b>	<b>No Trombosi</b>
<b>WT + a/a</b>	0	11
<b>WT + a/b</b>	2	10
<b>V617F + a/a</b>	19	43
<b>V617F + a/b</b>	4	23

Tab 6: Correlazione tra eventi trombotici e i diversi profili biomolecolari dei pazienti con MPN

In tabella 7 sono specificate le caratteristiche biomolecolari di ogni paziente che ha sofferto di complicanze trombotiche; non vi sono correlazioni tra i diversi profili molecolari e gli eventi trombotici in ambito arterioso o venoso.

	<b>Diagnosi PV/ET</b>	<b>Sede trombosi A/V</b>	<b>JAK2 V617F/WT</b>	<b>HPA-1</b>
<b>PD1</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD2</b>	ET	V	V617F	a/a
<b>PD3</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD4</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD5</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD6</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD7</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD8</b>	PV	V	V617F	a/a
<b>PD9</b>	PV	A	V617F	a/a

<b>PD10</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD11</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD12</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD13</b>	ET	V	V617F	a/b
<b>PD14</b>	ET	V	V617F	a/b
<b>PD15</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD16</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD17</b>	PV	A	V617F	a/a
<b>PD18</b>	PV	A	WT	a/b
<b>PD19</b>	PV	A	V617F	a/b
<b>PD20</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD21</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD22</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD23</b>	ET	A	V617F	a/a
<b>PD24</b>	PV	A	V617F	a/b
<b>PD25</b>	ET	A	WT	a/b
<b>Tot</b>	13PV/12/ET	21A/4V	23V617F/ 2WT	19a/a / 6a/b

Tab 7: Caratteristiche biomolecolari in rapporto alle complicanze trombotiche arteriose o venose dei nostri pazienti con MPN.

## RESISTENZA CLINICA ALL'ASPIRINA

Due degli 83 MPN in ASA (2.4%) hanno sofferto di eventi tromboembolici (2 IMA) durante il trattamento con aspirina.

## RELAZIONE TRA RESISTENZA CLINICA ALL'ASPIRINA E MUTAZIONE JAK2V617F

Tra i 25 pazienti con eventi trombotici, 16 sono stati studiati già in terapia con aspirina e quindi inseriti nel gruppo MPN in ASA, mentre gli altri 9 sono stati studiati prima di avviare il trattamento antiaggregante e sono stati quindi compresi nel gruppo MPN basali. L'incidenza di mutazione JAK2V617F nei MPN, trattati e non trattati con aspirina, non era statisticamente diversa (PV 91 e 89%; ET 69 e 87%, rispettivamente) (Fig 11).

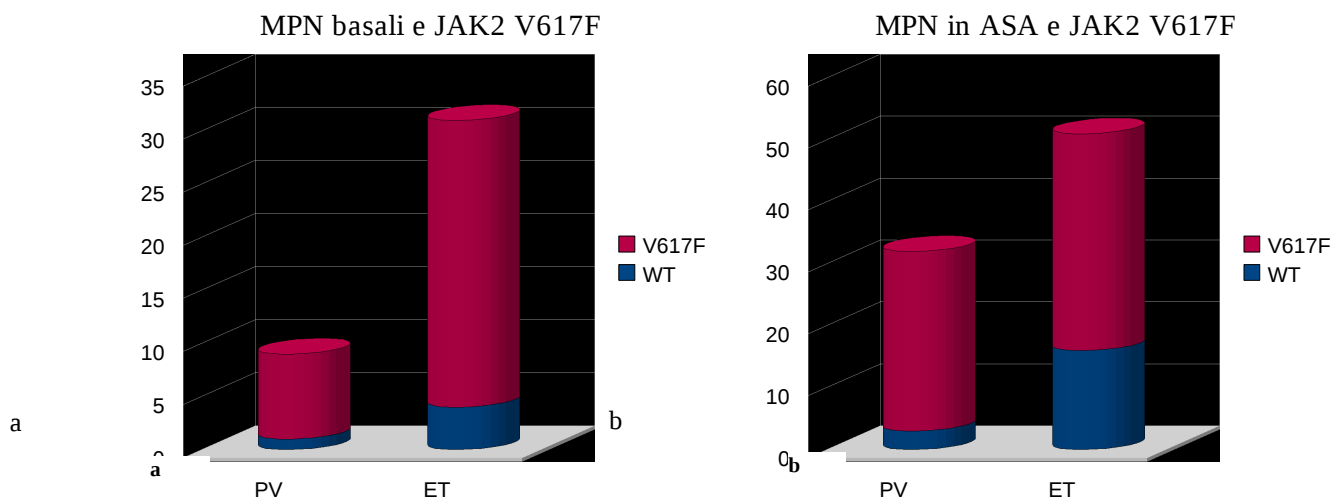


Fig 11: Incidenza della mutazione JAK2V617F nei pazienti con MPN basali (a) e in ASA (b) in studio

Tutti i 16 pazienti con trombosi del gruppo MPN in ASA (100%) erano portatori della mutazione JAK2V617F. Al contrario, la mutazione JAK2V617F era presente in 47 su 66 (71%) dei MPN in ASA che non hanno sviluppato complicanze trombotiche, né alla diagnosi né nel corso del follow-up. La maggiore frequenza della mutazione

JAK2V617F nel gruppo degli MPN che hanno sviluppato trombosi risulta statisticamente significativa (p=0,0172) (Tab 8).

		MPN basali (40)		MPN in ASA (83)	
		PV	ET	PV	ET
<b>N° pazienti</b>		9	31	32	51
<b>Trombosi</b>	V617F	3 (33.3%)	4 (12.9%)	9 (28.1%)	7 (13.7%)
	WT	1 (11.1%)	1 (3.2%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>No Trombosi</b>	V617F	5 (55.6%)	23 (74.2%)	20 (62.5%)	28 (54.9%)
	WT	0 (0%)	3 (9.7%)	0 (0%)	16 (31.4%)

Tab 8: Mutazione JAK2V617F ed eventi trombotici nei pazienti con MPN studiati, anche in relazione all'uso di aspirina.

La frequenza dell'allele raro b di HPA-1 non influenza significativamente lo sviluppo di eventi trombotici nei pazienti con MPN (Tab 9).

		MPN basali (40)		MPN in ASA (83)	
		PV	ET	PV	ET
<b>N° pazienti</b>		5	27	29	49
<b>Trombosi</b>	a/a	1 (20%)	4 (14.8%)	7 (24.1%)	7 (14.3%)
	a/b + b/b	3 (60%)	1 (3.7%)	2 (6.9%)	0 (0%)
<b>No Trombosi</b>	a/a	1 (20%)	12 (44.4%)	15 (51.7%)	27 (55.1%)
	a/b + b/b	0 (0%)	10 (37.1%)	5 (17.3%)	13 + 2 (26.5%+ 4.1%)

Tab 9: Frequenze rilevate nei campioni analizzati per il polimorfismo HPA-1 in pazienti MPN in terapia con aspirina.

## RESISTENZA FARMACOLOGICA ALL'ASPIRINA

### Aggregazioni su PRP

In condizioni basali, e cioè senza aspirina, tutti i Controlli (100%) e tutti gli MPN (100%) hanno mostrato una curva di aggregazione superiore al 85%.

Tutti i Controlli in ASA (100%) avevano una curva di aggregazione soppressa (<10%), mentre 22 MPN (26.5%) (15 ET e 7 PV) avevano curve di aggregazioni non inibite (80±16%).

La relazione tra le caratteristiche molecolari dei nostri pazienti e la soppressione, indotta dall'aspirina, dell'aggregazione in vivo è riassunta in tabella 10.

Aggregazioni	JAK2		p	HPA-1		p
	V617F	WT		a/a	a/b + b/b	
>10%	18	4	ns	14	8	ns
<10%	46	15	ns	41	15	ns

Tab 10: Correlazione della percentuale di aggregazione piastrinica con la frequenza della mutazione JAK2V617F e dell'allele raro b

Né la presenza della mutazione JAK2V617F (Fig 12a) né quella dell'allele raro b (Fig 12b) influenzano significativamente la risposta all'aspirina in base all'aggregazione rispettivamente (p=0.8 e p=0.42). Sei dei pazienti con aggregazione non soppressa (27.3%) erano sia JAK2 mutati che portatori dell'allele raro b.

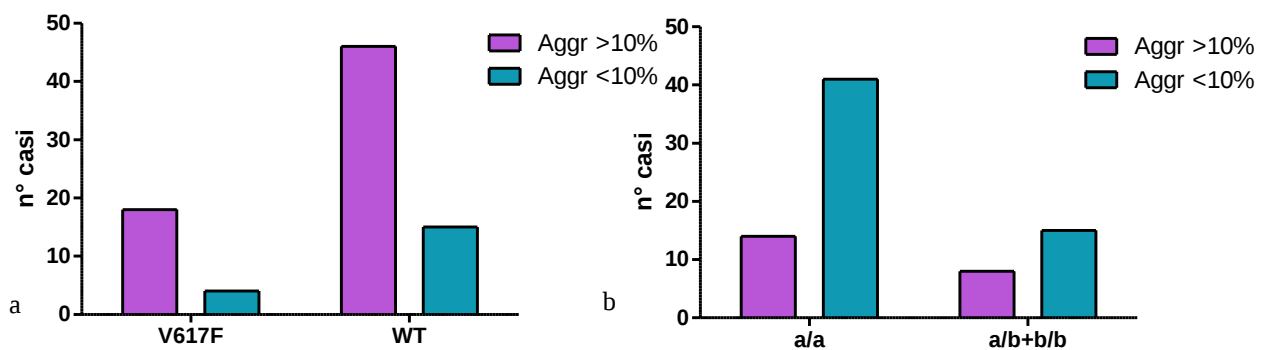


Fig 12: Correlazione della mutazione JAK2V617F (a) e del polimorfismo HPA-1 (b) con la resistenza all'aspirina determinata mediante test di aggregazione piastrinica.

Uno dei 2 pazienti con trombosi in corso di terapia con aspirina mostrava un'aggregazione del 90%.

## Dosaggio dei livelli di Trombossano (TxB<sub>2</sub>) con test ELISA

I valori di trombossano sierico totale e per piastrina sono riassunti in tabella 11:

	<b>Casi</b>	<b>Plts 10<sup>9</sup>/L</b>	<b>TxB<sub>2</sub> (pg/ml)</b>	<b>TxB<sub>2</sub> (pg/plts x 10<sup>-8</sup>)</b>
<b>Controlli</b>	42	223±17	36451±5745	25085±6788
<b>Controlli in ASA</b>	21	233±12	1095±170	441±65
<b>MPN basali</b>	22	700±45	45058±32515	32099±6650
<b>MPN in ASA</b>	77	750±115	5759±2881	1432±194

Tab 11: Livelli di TxB<sub>2</sub> totale e normalizzati in base al numero di piastrine

Non è stata trovata alcuna differenza statistica nei livelli di TxB<sub>2</sub> sierico tra i Controlli basali e gli MPN basali ( $p=0,75$ ) né tra gli MPN in ASA e i Controlli in ASA. Gli MPN basali hanno livelli di TxB<sub>2</sub> sierico significativamente maggiori degli MPN in ASA ( $p=0,0414$ ) e i Controlli significativamente superiori ai Controlli in ASA ( $p<0,0001$ ). Confrontando il TxB<sub>2</sub> normalizzato in base al numero di piastrine di ogni singolo paziente, non è stata trovata differenza tra Controlli basali e MPN basali ( $p=0,5$ ), i

Controlli basali avevano livelli di TxB2 significativamente maggiori dei Controlli in ASA ( $p=0,019$ ); gli MPN basali maggiori degli MPN in ASA ( $p<0,0001$ ) e gli MPN in ASA significativamente maggiori dei Controlli in ASA ( $p<0,0001$ ) (Fig 13).

Entrambi i casi di MPN in ASA che avevano sviluppato una trombosi presentavano livelli di TxB2 non inibito.

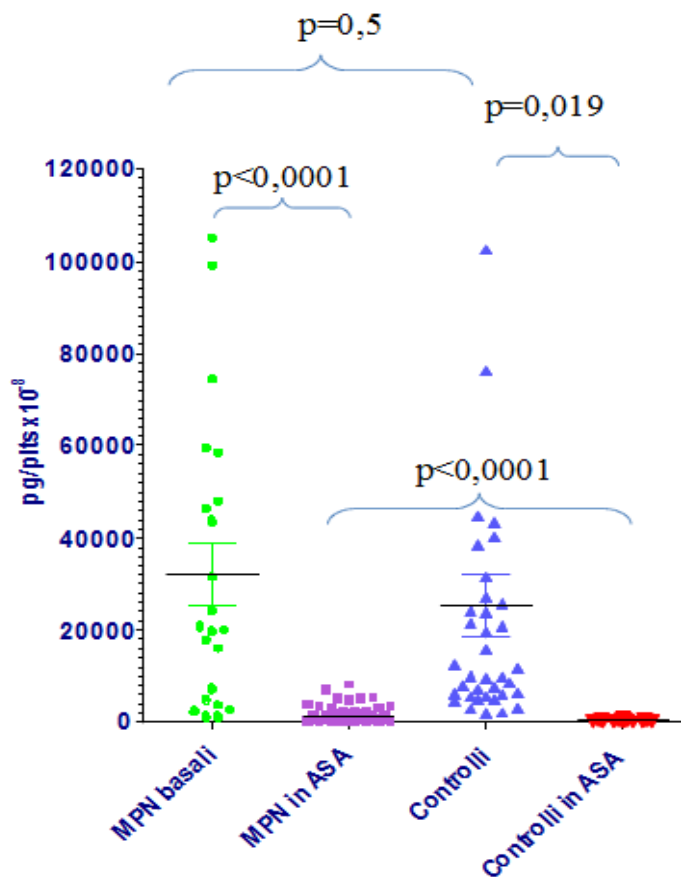


Fig 13: Comparazione dei valori di TxB2 piastrinico tra i vari gruppi di pazienti e controlli sottoposti o meno a terapia

Con una curva ROC (Fig 14) si è stabilito che un valore di TxB2 pari a  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$  (specificità 85%, sensibilità 91%) rappresenta il cut-off per distinguere i pazienti in

cui la terapia con aspirina determina un'efficace inibizione della produzione di TxB2 (Fig 14).

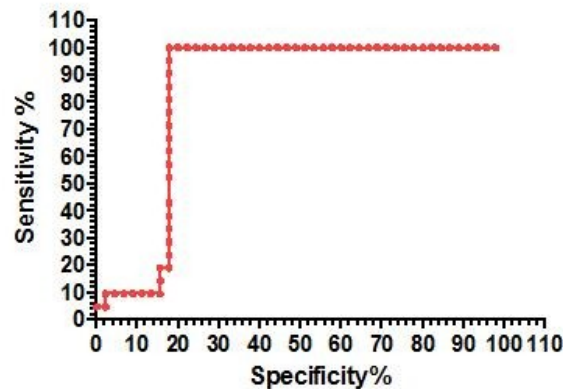


Fig 14: Curva ROC: il valore soglia di 948 pg/plts x 10<sup>-8</sup> che identifica i livelli di TxB2 dei pazienti resistenti all'aspirina con elevate specificità (85%) e sensibilità (91%).

Nessuno dei Controlli basali né degli MPN basali mostrava un valore di TxB2 inferiore a 948 pg/plts x 10<sup>-8</sup>, mentre 2 Controlli in ASA (9,5%) e 37 (48%) MPN in ASA mostravano livelli maggiori risultando, quindi, farmacologicamente resistenti. Tra questi, 30 (81%) presentavano la mutazione JAK2V617F e 12 (32%) l'allele raro b in eterozigosi; in 10 (27%) vi erano entrambe le caratteristiche biomolecolari (Tab 12).

Livelli TxB2	JAK2		p	HPA-1		p
	V617F	WT		a/a	a/b	
>948 pg/plts x 10 <sup>-8</sup>	30	7	ns	25	12	ns
<948 pg/plts x 10 <sup>-8</sup>	35	5	ns	20	9	ns

Tab 12: Correlazione dei valori di TxB2 dosati con la frequenza dell'allele raro b e della mutazione JAK2V617F. Dividendo pazienti e controlli in base al cut-off stabilito, non sono state trovate differenze biomolecolari tra i due gruppi

## RELAZIONE TRA RESISTENZA FARMACOLOGICA ALL'ASPIRINA VALUTATA CON AGGREGAZIONE E DOSAGGIO DEL TROMBOSSANO

18 MPN in ASA (25%) aggregavano normalmente e presentavano livelli di TxB2 elevato malgrado l'uso di aspirina (resistenti farmacologicamente all'aspirina) (Fig 15).

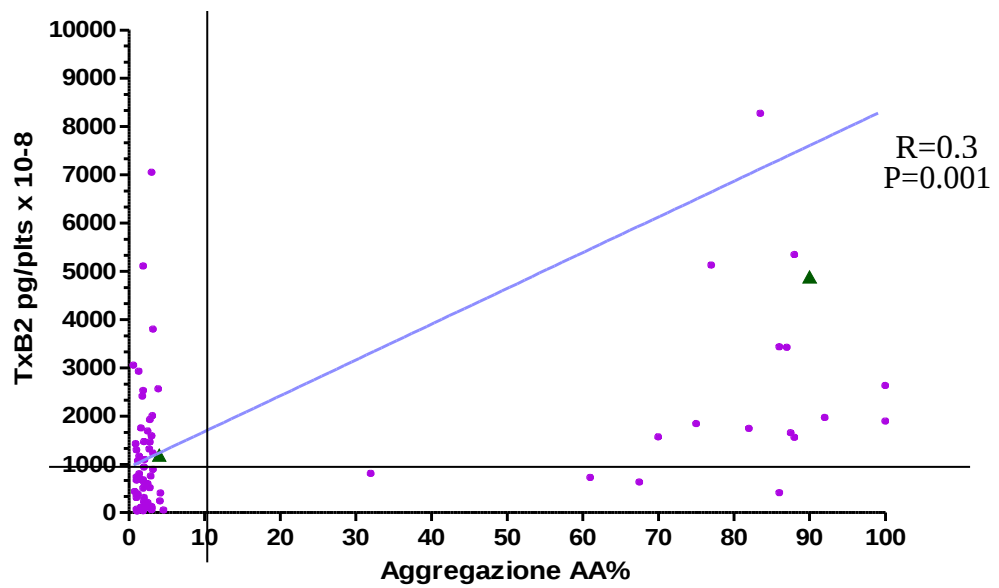


Fig 15: Relazione tra livelli di TxB2 e aggregazione piastrinica in 77 MPN in terapia con aspirina. I 18 casi nel quadrante superiore destro non dimostrano riduzione né della percentuale di aggregazione né dei livelli di TxB2, nonostante la terapia. I due punti evidenziati in verde corrispondono ai dati ottenuti nei due pazienti resistenti clinicamente all'aspirina. I 32 casi del quadrante inferiore sinistro sono completamente responsivi all'aspirina in quanto presentano ridotta curva di aggregazione dopo stimolo con AA e livelli di TxB2 < 948 pg/plts x 10<sup>-8</sup>.

I livelli di TxB2 piastrinico sono risultati significativamente più elevati negli MPN nei quali l'aspirina non otteneva una adeguata soppressione dell'aggregazione (Fig 16 a) e la percentuale di aggregazione era significativamente più elevata negli MPN in ASA con livelli piastrinici di TxB2 >948 pg/ plts x 10<sup>-8</sup> (Fig 16 b).

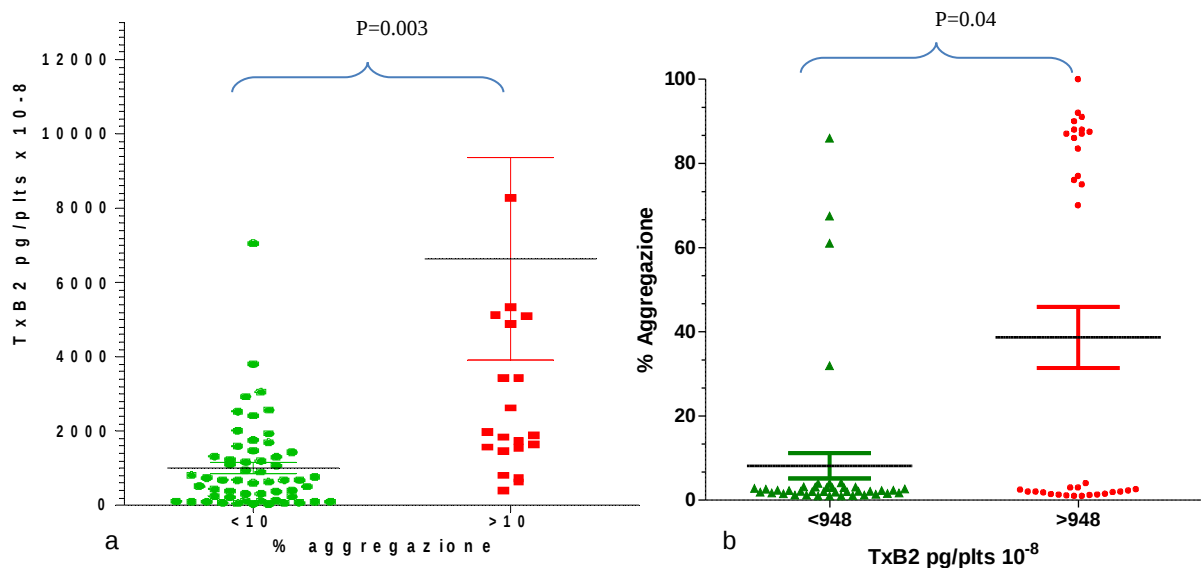


Fig 16: I livelli di TxB2 piastrinico risultano più elevati nei casi di MPN in cui l'aggregazione piastrinica non è inibita dall'aspirina rispetto a quelli con aggregazione soppressa (a); analogamente, gli MPN in ASA con TxB2 >948 pg/plts 10<sup>-8</sup> presentano percentuali di aggregazioni dopo stimolo con acido arachidonico statisticamente maggiori (b).

## RELAZIONE TRA RESISTENZA CLINICA E FARMACOLOGICA ALL'ASPIRINA

Entrambi i casi che hanno sviluppato complicanze trombotiche durante la terapia con aspirina avevano livelli di TxB2 maggiori di 948 pg/ plts x 10<sup>-8</sup>, ma solo uno di essi aveva anche l'aggregazione non inibita. Le loro principali caratteristiche sono riassunte in tabella 14:

	<b>Paz 1</b>	<b>Paz 2</b>
<b>Trombosi</b>	IMA	IMA
<b>Sesso/età</b>	M / 69 anni	M / 60 anni
<b>MPN</b>	ET	ET
<b>Fatt di rischio</b>	Fumo	Fumo/ipertensione
<b>JAK2</b>	V617F	V617F
<b>HPA-1</b>	a/a	a/a
<b>Aggregazione</b>	0%	90%
<b>TxB2 pg/ml</b>	205	218
<b>TxB2 pg/plts x 10<sup>-8</sup></b>	1192	4885

Tab 14: Caratteristiche cliniche, biomolecolari e resistenza farmacologica dei due casi MPN in ASA con trombosi malgrado la terapia in corso

## DISCUSSIONE

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di mortalità e morbilità nella società industrializzata di questo secolo. I problemi tromboembolici sono prevalentemente causati da rotture di placche aterosclerotiche in cui vengono esposti gli elementi trombogenici che inducono le piastrine ad aderire alle pareti del vaso danneggiato stimolando ulteriormente la formazione di trombi (Mason PJ et al, 2005). E' evidente dunque come l'inibizione dell'aggregazione piastrinica giochi un ruolo chiave nella prevenzione e trattamento delle malattie tromboemboliche. L'acido acetilsalicilico, o aspirina, a basso dosaggio è il più comune farmaco antiaggregante utilizzato largamente in quanto molto efficace e poco costoso. L'aspirina, infatti, viene comunemente prescritta per la prevenzione, sia primaria che secondaria, degli eventi trombotici (Antiplatelet Trialist's Collaboration, 2002). Poiché le piastrine mancano completamente della possibilità di sintesi proteica, una singola dose di aspirina (75-150 mg/die) è in grado di bloccare la produzione di TxA2 per l'intera vita della piastrina (Weskler BB et al, 1983).

La letteratura però, da anni riporta che circa un quarto dei soggetti in terapia con aspirina risultano clinicamente resistenti a questo farmaco (Antiplatelet Trialist's Collaboration, 2002) e le recenti metanalisi di Krasopoulos (Krasopoulos G et al, 2008) e di Hovens (Hovens M et al, 2007) hanno confermato tale osservazione.

Questi individui infatti, malgrado l'uso di aspirina, sviluppano complicanze trombotiche e molte sono le ipotesi proposte per spiegare tale fenomeno: scarsa compliance dei pazienti (Cotter G et al, J 2004), probabilmente la più comune causa di fallimento di questa terapia, fattori di biodisponibilità (Bhatt DL, 2004), fattori cellulari, in particolare una incompleta inibizione di COX-1 (Davi G et al, 2004, Pulcinelli FM et

al, 2005) o genetici, quali il polimorfismo HPA-1, che sembrano favorire lo sviluppo di eventi trombotici (Newman PJ et al, 1995) e i polimorfismi della beta(3)-integrina o del fattore XIII (Undas A et al, 2007).

In realtà, sarebbe più corretto definire questi casi come “fallimenti terapeutici”, dato che propriamente “resistenti ad un farmaco” sono solo i casi in cui il farmaco non è capace di raggiungere il suo bersaglio per scarsa biodisponibilità o per alterazioni del target stesso (Patrono C, 2003). Perciò la definizione di resistenza all’aspirina andrebbe riservata a situazioni in cui l’aspirina non è in grado di inibire la produzione di TxA<sub>2</sub> COX-1 dipendente. Tale mancata inibizione può essere documentata con il riscontro di livelli di trombossano non inibiti o, in modo indiretto, con l’osservazione di aggregazione all’acido arachidonico non soppressa (Cattaneo M et al, 2007; Pulcinelli FM et al, 2005).

Anche i pazienti affetti da MPN vengono trattati abitualmente con aspirina a basse dosi dato che le complicanze trombotiche sono la principale causa di morbilità e mortalità in questi pazienti (Elliott MA et al, 2005). Lo studio ECLAP del 2004 (Landolfi R et al, 2004) ha dimostrato che l’aspirina a basse dosi è efficace nella prevenzione delle complicanze tromboemboliche dei pazienti affetti da PV; questa raccomandazione vale anche per i pazienti affetti da ET (Barbui T et al, 2011), perlomeno se soffrono di disturbi del microcircolo o hanno avuto precedenti complicanze trombotiche, anche se non tutti gli autori concordano su questo orientamento (Harrison CN et al, 2010). I pazienti con ET infatti, soprattutto con piastrinosi molto elevate (maggiori di  $1500 \times 10^9/L$ ) presentano un importante rischio emorragico e alcuni farmaci citoreducenti in associazione all’aspirina (Harrison CN et al, 2005) possono facilitare i sanguinamenti.

A nostra conoscenza non sono disponibili notizie relative alla resistenza clinica e/o farmacologica all’aspirina nei pazienti affetti da MPN, pur essendo molti di essi in

trattamento antiaggregante. Solo uno studio su pazienti affetti da PV in trattamento con aspirina (Santilli F et al, 2008) evidenzia una ridotta rigenerazione dell'endotelio associata a residua elevata formazione di TxA2 in confronto con i soggetti sani. Lo scopo del nostro studio, dunque, è stato di valutare la resistenza all'aspirina nei pazienti affetti da MPN seguiti presso il nostro Dipartimento e di accertare eventuali relazioni con le caratteristiche biomolecolari di questi malati.

Solo due dei nostri pazienti con MPN hanno sviluppato un evento trombotico in corso di terapia con aspirina. Sembrerebbe dunque che l'incidenza di resistenza clinica all'aspirina sia inferiore nei casi di MPN rispetto alla popolazione generale, stimata nelle diverse casistiche tra il 5.5 e il 61% (Campbell CL et al, 2005). I malati con MPN, sono, d'altra parte, strettamente monitorati nel nostro ambulatorio dedicato a tali patologie e sono rigorosamente istruiti ad attenersi in modo scrupoloso alle nostre prescrizioni; pensiamo quindi che, nel nostro caso, la compliance sia notevole.

La quasi totalità dei pazienti con PV e poco più della metà di quelli con ET riportati nel nostro studio sono risultati portatori della mutazione JAK2V617F in accordo con i dati della letteratura (Baxter EJ et al, 2005; Vannucchi AM et al, 2007). Si è molto dibattuto in questi anni per chiarire se i casi di ET mutati sono a maggior rischio di complicanze trombotiche di quelli non-mutati (Kralovics et al, 2005; Campbell PJ et al, 2005). Gli ultimi dati pubblicati sembrano dimostrare che i soggetti portatori della mutazione vanno incontro più comunemente a patologia ischemica (De Stefano V et al, 2009; Pacquola E et al, 2009) soprattutto quelli con un elevato allele burden (Passamonti F et al, 2010) e, in accordo, i nostri pazienti che avevano manifestato eventi tromboembolici erano nella gran maggioranza portatori della mutazione JAK2V617F.

Si è ipotizzato che la presenza dell'allele raro b sia associata ad una elevata formazione di trombina e ad una conseguente inadeguata azione dell'aspirina che potrebbe favorire

in particolare le trombosi coronariche (Undas A et al, 2001; Cambria-Kiely JA et al, 2002), ma non tutti gli autori concordano su questa osservazione (Macchi L et al, 2003). Una metanalisi del 2008 (Goodman T et al, 2008) ha suggerito che la resistenza all'aspirina non sia strettamente correlata con la presenza del polimorfismo HPA-1, pur confermando che la presenza di tale polimorfismo facilita gli eventi cardiovascolari.

La frequenza dell'allele raro b da noi trovata nei pazienti MPN è simile a quella della popolazione generale (Newman PJ, 1997), e, in particolare, di una popolazione del Triveneto (dati non riportati) da noi studiata. Dato che alcuni autori (Wang SY et al, 2004) avevano segnalato una elevata frequenza di allele raro b nelle MPN con trombosi delle vene splancniche, abbiamo tentato di correlare la presenza di questo polimorfismo con lo sviluppo di eventi trombotici in pazienti MPN (Candeo N et al, 2009). Come già da noi pubblicato nelle MPN con trombosi in sedi rare (Randi ML et al, 2007), l'osservazione di Wang non è stata confermata e i nostri risultati sembrano escludere che la resistenza all'aspirina nelle MPN sia legata ai polimorfismi della GPIIIA.

L'aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico è un test molto dispendioso in termini di tempo e richiede personale addestrato in grado di maneggiare il campione entro pochi minuti dal prelievo (Cattaneo M, 2007). Nella nostra esperienza, circa un quarto degli MPN in ASA dimostrava una marcata aggregabilità residua, superando di molto il limite del 10% identificato come espressione di mancata soppressione iatrogena (Pulcinelli FM et al, 2004). Al contrario, l'aggregazione sotto stimolo di AA in una popolazione sana trattata con aspirina 100 mg/die, non ha rivelato casi resistenti (Gonzalez-Conejero R et al, 2005) ed anche in oltre 200 pazienti in terapia abituale, la resistenza all'aspirina valutata con questo metodo è risultata rarissima (Tantry et al, 2005). La discrepanza dei nostri risultati rispetto alla letteratura può trovare spiegazione

nell'età avanzata dei nostri pazienti, nell'uso di aspirina gastro-protetta (Maree AO et al, 2005) e nell'elevato numero di piastrine (Rocca B et al, 1995).

Abbiamo tentato anche di valutare l'attività piastrinica residua con il Platelet Function Analyzer (PFA-100) utilizzando cartucce collagene/epinefrina (dati non riportati). Si tratta di un sistema molto veloce, completamente automatizzato che nell'arco di pochi minuti fornisce informazioni su eventuali disfunzioni piastriniche (Koscielny J, et al, 2004). Tuttavia, il PFA-100 è tarato per lavorare con conte piastriniche inferiori alle  $500 \times 10^9/L$ , mentre comunemente i malati con MPN hanno un numero di piastrine più elevato. Il metodo non ci ha dato soddisfazione e si è rivelato inadeguato ai nostri scopi; infatti, buona parte degli MPN in ASA dimostrava un tempo di chiusura del capillare molto lungo che spesso si avvicinava al limite massimo.

Poiché il target farmacologico dell'aspirina è l'inibizione della sintesi del TxA<sub>2</sub>, il dosaggio del TxB<sub>2</sub> è considerato il test più adeguato per stabilire l'efficacia della terapia con aspirina (Cattaneo M, 2007; Ohmori T. et al, 2006).

Nella nostra casistica, Controlli e MPN basali sono risultati avere livelli di TxB<sub>2</sub> senza differenze statisticamente rilevabili (Tezza F et al, 2010; Vettore S et al, 2010) e il dato si confermava dopo normalizzazione in base alla conta piastrinica. Altri Autori (Rocca B et al, 1995) hanno trovato livelli di TxB<sub>2</sub> urinario significativamente più elevati in 40 soggetti affetti da ET rispetto ai controlli sani e concludendo che conte piastriniche elevate determinano l'attivazione piastrinica osservata in vivo, nonostante in 5 casi i livelli di TxB<sub>2</sub> si riducessero dopo la somministrazione di aspirina. I diversi nostri risultati possono trovare giustificazione nella grande variabilità dei valori piastrinici da noi osservati poiché la nostra casistica comprende sia pazienti affetti da PV che da ET.

La costruzione di una curva ROC ci ha permesso di stabilire un valore di TxB<sub>2</sub> ( $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$ ) appropriata per discriminare i casi "resistenti" da quelli efficacemente

trattati con aspirina. In base a tale valore, sono stati identificati 37 casi di MPN resistenti all'aspirina, pari a quasi la metà dei pazienti testati, il che è in accordo con quanto riportato da Maree (Maree AO et al, 2005), che stima attorno al 44%, ma non da Frelinger (Frelinger AL et al, 2006), che valuta in 2% circa i resistenti in base al dosaggio del TxB2 tra la popolazione generale. D'altra parte anche tra i Controlli in ASA da noi studiati, la percentuale di casi in cui il TxB2 non era soppresso (10%) era più elevata di quanto riportato dalla letteratura, seppure minore di quanto osservato negli MPN in ASA. Probabilmente la maggiore frequenza di resistenza farmacologica trovata da noi in confronto a Frelinger (Frelinger AL et al, 2006) nella popolazione generale può essere dovuta al piccolo numero di casi da noi valutati. La differenza di casi resistenti tra i controlli e gli MPN, invece, può trovare spiegazione nel fatto che, mentre i pazienti MPN erano studiati in occasione di una delle loro visite semestrali e quindi la regolare e corretta assunzione di aspirina era delegata solo ai pazienti stessi, i Controlli in ASA erano tutti pazienti ricoverati presso la nostra Unità che quindi ricevevano il farmaco dal personale infermieristico. Potevamo dunque essere certi, ad esempio, che i controlli non avessero assunto dei FANS, che notoriamente limitano l'effetto cardioprotettivo dell'aspirina (Catella-Lawson et al, 2001). Inoltre, è possibile che la maggior frequenza di resistenza all'aspirina dimostrata tra i nostri pazienti trovi giustificazione nell'età avanzata e nell'uso di aspirina gastro-protetta (Maree AO, 2005). A sostegno di quanto da noi osservato, anche in 22 pazienti con PV, il TxB2 sierico era significativamente più alto che in 6 soggetti normali malgrado la terapia con aspirina (Santilli F et al, 2008). E' anche importante sottolineare che i nostri pazienti hanno conte piastriniche elevate a causa della loro malattia mieloproliferativa e che, perciò, possano aver bisogno di una dose di aspirina maggiore dei soggetti con numero

di piastrine normali per ottenere una inibizione completa dell'attività di COX (Rocca B et al, 1995).

In circa un quarto dei nostri pazienti con MPN tanto i risultati dell'aggregazione e che del dosaggio di TxB2 erano coerenti con la presenza di resistenza all'aspirina in accordo con quanto pubblicato da altri (Maree AO et al, 2005) che hanno osservato che i pazienti con TxB2 non inibito presentano aggregazioni con acido arachidonico più comunemente non sopresse.

Molto si è scritto sulla relazione tra resistenza clinica e resistenza farmacologica all'aspirina: alcuni autori ritengono che siano sovrapponibili (Hovens MM et al, 2007; Krasopoulos G et al, 2007), ma una metanalisi su oltre 2500 pazienti (Snoep JD et al, 2008) ha confermato che la resistenza clinica interessa circa il 25% dei pazienti, mentre quella farmacologica è variabile dal 5% al 65%, e dipendente dai test utilizzati.

Tra i nostri pazienti con MPN, solo due hanno effettivamente sviluppato un evento trombotico durante la terapia con aspirina e solo uno di loro aveva una convincente resistenza farmacologica dimostrata in laboratorio sia per la mancata soppressione dell'aggregazione che per l'inibizione della produzione di TxB2. Entrambi i soggetti erano maschi, affetti da ET, portatori della mutazione V617F e fumatori ed hanno sviluppato un secondo infarto miocardico: è difficile pensare che la complicità trombotica vada attribuita a "resistenza" all'aspirina.



## CONCLUSIONI

La mutazione JAK2V617F è risultata presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da MPN che avevano presentato un evento trombotico: siamo pertanto convinti che la presenza della mutazione debba essere considerata un fattore di rischio protrombotico.

La presenza dell'allele raro b di HPA-1 non sembra invece correlabile con le complicanze trombotiche dei pazienti con MPN.

Non sembra esista alcuna relazione tra la presenza di mutazione JAK2 o del polimorfismo raro HPA-1 e la resistenza all'aspirina.

I nostri dati sembrano suggerire che tra i pazienti con MPN vi sia maggiore probabilità di incontrare resistenze farmacologiche all'aspirina 100 mg/die rispetto a quanto avviene nella popolazione generale

L'aggregazione piastrinica indotta da AA è risultata capace di identificare la resistenza all'aspirina in circa il 25% dei pazienti con MPN.

Un livello superiore a  $948 \text{ pg/plts} \times 10^{-8}$  di TxB2 stabilisce la mancata soppressione del TxB2 da parte dell'aspirina

Il dosaggio del TxB2 è risultato capace di identificare la resistenza all'aspirina in circa la metà dei pazienti con MPN.

Non è stata riconosciuta alcuna relazione tra la resistenza clinica e la resistenza farmacologica determinata con l'aggregazione sotto stimolo di acido arachidonico e con i livelli di TxB2.

Rimangono aperti importanti quesiti, nei pazienti con MPN non diversamente che per i soggetti in prevenzione secondaria:

- Sarebbe indicato valutare la resistenza all'aspirina dopo un periodo di trattamento per stabilire se il farmaco è efficace nel sopprimere la produzione di TxB2 e l'attività aggregante delle piastrine?
- Se ci si orientasse in tale senso, il riscontro in laboratorio di resistenza all'aspirina, dovrebbe suggerire incrementi del dosaggio del farmaco?
- Oppure, l'aspirina dovrebbe essere sostituita da altri farmaci antiaggreganti con evidenti problemi anche di natura economica?

## BIBLIOGRAFIA

- Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ*. 1994 8; 308: 81-106.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002 12; 324: 71-86.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005; 19: 1847-9.
- Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*. 2000 14; 101: 1206-18.
- Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato LN, Marchetti M, Mazzucconi MG, Rodeghiero F, Tura S. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2004; 89: 215-32.
- Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Hehlmann R, Hoffman R, Kiladjan JJ, Kröger N, Mesa R, McMullin MF, Pardanani A, Passamonti F, Vannucchi AM, Reiter A, Silver RT, Verstovsek S, Tefferi A. [Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet](#). *J Clin Oncol*. 2011
- Bhatt DL. Peripheral arterial disease in the catheterization laboratory: an underdetected and undertreated risk factor. *Mayo Clin Proc*. 2004; 79: 1107-9.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 19-25;365: 1054-61
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer

Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 19-25; 365: 1054-61.

- Bellucci S, Janvier M, Tobelem G, Flandrin G, Charpak Y, Berger R, Boiron M. Essential thrombocythemias. Clinical evolutionary and biological data. *Cancer*. 1986 1; 58: 2440-7.
- Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 15-28.
- Bhatt DL. Peripheral arterial disease in the catheterization laboratory: an underdetected and undertreated risk factor. *Mayo Clin Proc*. 2004; 79:1107-9.
- Birgegård G. New perspectives in managing myeloproliferative disorders: focus on the patient. *Hematol Oncol*. 2009; 27 Suppl 1:5-7.
- Bontadini A, Tazzari PL, Manfroi S, Ruscitto MC, Fruet F, Conte R. Human-platelet-antigen and neutrophil-antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica*. 2000; 85: 430-1.
- Buss DH, Stuart JJ, Lipscomb GE. The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: an analysis of 129 cases. *Am J Hematol*. 1985; 20: 365-72.
- Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. 2002; 14: 51-8.
- Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Possible mechanisms of aspirin resistance. *J Thromb Thrombolysis*. 2002; 13: 49-56.
- Campbell CL, Steinhubl SR. [Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance?](#) *J Thromb Haemost*. 2005;3:665-9.
- Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2452-66.
- Candeo N., Lombardi A.M., Tezza F., Scandellari R., Fabris F., Randi M.L. HPA-1 polymorphisms in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (Ph-MPN) does not increase the risk of thrombotic complications. *Haematologica* 2009; 94 (s4): 198.
- Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, Borrelli G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential

- thrombocytopenia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood*. 2007 15; 109: 2310-3.
- Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA. [Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin](#). *N Engl J Med*. 2001; 345:1809-17.
  - Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 Suppl 1:230-7.
  - Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1980-7.
  - Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocytopenia. *J Clin Oncol*. 1990; 8:556-62.
  - Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A. [Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin?](#) *Am Heart J*. 2004;147:293-300.
  - Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke*. 2006; 37: 2153-8.
  - Davì G, Falco A, Patrono C. Determinants of F2-isoprostane biosynthesis and inhibition in man. *Chem Phys Lipids*. 2004; 128:149-63.
  - De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, Micò C, Tieghi A, Cacciola RR, Santoro C, Vianelli N, Guglielmelli P, Pieri L, Scognamiglio F, Cacciola E, Rodeghiero F, Pogliani EM, Finazzi G, Gugliotta L, Leone G, Barbui T; GIMEMA Chronic Myeloproliferative Neoplasms Working Party. Increased risk of recurrent thrombosis in patients with essential thrombocytopenia carrying the homozygous JAK2 V617F mutation. *Ann Hematol*. 2010; 89:141-6.
  - Dreser H. *Archiv für die Gesamte Physiologie* 1899;76:306-18 (transl). In: Krantz JC, editor. *Historical medical classics involving new drugs*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1974.
  - Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2005; 128: 275-90.
  - Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and

hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96: 4261-6.

- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol*. 2007;35: 702-11.
- Federici AB, Rand JH, Mannucci PM. Acquired von Willebrand syndrome: an important bleeding complication to be considered in patients with lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. *Hematol J*. 2001; 2: 358-62.
- Finazzi G, Barbui T. How I treat patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109:5104-11
- Frelinger AL 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation*. 2006;113:2888-96.
- Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuña C, Guerrero JA, Vicente V. [Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure?](#) *Stroke*. 2005;36:276-80.
- Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66: 222-232
- Grosser T, Fries S, Fitzgerald GA. Thromboxane Generation in: Platelets Michelson AD, Academic Press, Elsevier Sciences, 377-402.
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 200;88: 230-5.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006; 367:606-17.
- Harrison CN. Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:409-15.
- Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. [Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia](#). *N Engl J Med*. 2005; 353:33-45.

- Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, Erber W, Everington T, Green AR, Hall GW, Hunt BJ, Ludlam CA, Murrin R, Nelson-Piercy C, Radia DH, Reilly JT, Van der Walt J, Wilkins B, McMullin MF; British Committee for Standards in Haematology. [Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis](#). Br J Haematol. 2010;149:352-75.
- Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. Am Heart J. 2007; 153:175-81.
- Ichiki K, Ikeda H, Haramaki N, Ueno T, Imaizumi T. Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release. Circulation. 1996; 94: 3109-14.
- James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couédic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. Leukemia. 2006;20:350-3
- James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couédic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. Leukemia. 2006; 20: 350-3.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Thorsen S, Hasselbalch HC. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. Am J Hematol. 2002;69: 185-91.
- Kassum D, Thomas EJ. Morbidity and mortality of incidental splenectomy. Can J Surg. 1977; 20: 209-14.
- Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:533-7.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Gene. 2002;285: 1-24.
- Koscielny J, von Tempelhoff GF, Ziemer S, et al. A practical concept for preoperative management of patients with impaired primary hemostasis. Clin Appl Thromb Hemost. 2004;10:155-66

- Kovanen PE, Junttila I, Takaluoma K, Saharinen P, Valmu L, Li W, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood*. 2000;95: 1626-32.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1779-90.
- Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008; 336:195-8.
- Landolfi R, Ciabattoni G, Patrignani P, Castellana MA, Pogliani E, Bizzi B, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood*. 1992; 80: 1965-71.
- Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, Tognoni G, Marchioli R; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007; 109:2446-52.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004; 350: 114-24.
- Lawrence FB, Stalker TJ, Zhu L, Woulfe DS. Signal transduction during platelet plug formation in: *Platelets* Michelson AD, Academic Press, Elsevier Sciences, 319-442.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006; 107: 4139-41.
- Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B,

- Deininger MW. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; 106: 3377-9.
- Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem*. 2006; 281: 7002-11.
  - Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 1115-9.
  - Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *Thromb Haemost*. 2005; 3:2340-5.
  - Mason PJ, Jacobs AK, Freedman JE. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 986-93.
  - McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:272-7.
  - Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation*. 2000; 101:1013-8.
  - Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK; Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; Working Group on Aspirin Resistance. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1309-11.
  - Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Variable platelet

response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost.* 1997; 78:1003-7.

- Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtmann S. Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol.* 2002;119:558-66
- Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell.* 1998; 93:397-409.
- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PLA1 and PLA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest.* 1989; 83:1778-81.
- Newman PJ, Valentin N. Human platelet alloantigens: recent findings, new perspectives *Thromb Haemost.* 1995; 74:234-9.
- Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997; 349:370-1.
- Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:1271-8.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998; 93:385-95.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood.* 2006;107: 3676-82.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. [A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 \(V617F\) allele burden](#)

[and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications.](#) Leukemia. 2010.

- Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest.* 1982; 69:1366-72.
- Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1710-3.
- Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med.* 1994; 330:1287-94.
- Pearson TC. Hemorheologic considerations in the pathogenesis of vascular occlusive events in polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost.* 1997; 23: 433-9.
- Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:979-84.
- Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, Pignatelli P, Trifirò E, Di Renzo L, Violi F. Persistent production of platelet thromboxane A<sub>2</sub> in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:2784-9.
- Randi ML, Lombardi AM, Scapin M, Tezza F, Scandellari R, Ruzzon E, Duner E, Fabris F. Haemostatic proteins gene polymorphisms in patients with unusual vein thrombosis and Ph-myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost.* 2007; 98:702-4.
- Regev A, Stark P, Blickstein D, Lahav M. Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts. *Am J Hematol.* 1997; 56:168-72.
- Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 1999; 283:990-3.
- Ridker PM, Manson JE, Buring JE, Goldhaber SZ, Hennekens CH. The effect of chronic platelet inhibition with low-dose aspirin on atherosclerotic progression and acute thrombosis: clinical evidence from the Physicians' Health Study. *Am Heart J.* 1991; 122:1588-92.
- Rocca B, Ciabattini G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia. *Thromb Haemost.* 1995; 74:1225-30.

- Sandberg EM, Ma X, VonDerLinden D, Godeny MD, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates angiotensin II-dependent inactivation of ERK2 via induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem*. 2004; 279:1956-67.
- Sanderson S, Emery J, Baglin T, Kinmonth AL. Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. *Ann Intern Med*. 2005; 142:370-80.
- Santilli F, Romano M, Recchiuti A, Dragani A, Falco A, Lessiani G, Fioritoni F, Lattanzio S, Mattoscio D, De Cristofaro R, Rocca B, Davì G. [Circulating endothelial progenitor cells and residual in vivo thromboxane biosynthesis in low-dose aspirin-treated polycythemia vera patients](#). *Blood*. 2008;112:1085-90.
- Scott LM, Beer PA, Bench AJ, Erber WN, Green AR. Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2007; 139:511-2.
- Seubert N, Royer Y, Staerk J, Kubatzky KF, Moucadel V, Krishnakumar S, Smith SO, Constantinescu SN. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell*. 2003;12:1239-50.
- Skoda RC. Thrombocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:159-67.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996; 271:33157-60.
- Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167:1593-9.
- Storen EC, Tefferi A. Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocythemia. *Blood*. 2001; 97:863-6.
- Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1705-9.
- Tefferi A, Passamonti F. Essential thrombocythemia and pregnancy: Observations from recent studies and management recommendations. *Am J Hematol*. 2009; 84:629-30.

- Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*. 2009; 115:3842-7.
- Tezza F, Vettore S, Candeo N, Bonamigo E, Fabris F, Randi ML. Preliminary data on serum thromboxane B2 (TxB2) in ASA-resistant patients with myeloproliferative neoplasms (MPN). *Haematologica* 2010; 95(s3): 126
- The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12th ed. London: Chapman and Hall, 1996:886.
- Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. PI(A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation*. 2001; 104:2666-72.
- Undas A, Placzkiewicz-Jankowska E, Zieliński L, Tracz W. Lack of aspirin-induced decrease in thrombin formation in subjects resistant to aspirin. *Thromb Haemost*. 2007; 97:1056-8.
- Vane JR, Sotting RM. The history of aspirin. In: Vane JR, Bolting RM, editors. *Aspirin and other salicylates*. London: Chapman and Hall. 1992:3-16.
- van Genderen PJ, Michiels JJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, van Vliet HH. Acquired von Willebrand disease as a cause of recurrent mucocutaneous bleeding in primary thrombocythemia: relationship with platelet count. *Ann Hematol*. 1994;69:81-4.
- Vannucchi AM, Barbui T. Thrombocytosis and thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:363-70.
- Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rambaldi A, Bogani C, Barbui T. Epigenetic therapy in myeloproliferative neoplasms: evidence and perspectives. *J Cell Mol Med*. 2009; 13:1437-50.
- Vettore S, Tezza F, Candeo N, Bonamigo E, Fabris F, Randi ML. Serum thromboxane B2 (TxB2) in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) treated with low doses of aspirin (ASA): preliminary data. *Blood Transfus* 2010; 8 (s4): 130
- Wang SY, Wei YF, Li JD. The relationship between beta fibrinogen gene-455G/A polymorphisms and Budd-Chiari syndrome. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2004; 43: 753-7553.

- Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J.* 2006; 27:647-54.
- Wautier MP, El Nemer W, Gane P, Rain JD, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C, Wautier JL. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood.* 2007; 110:894-901.
- Weksler BB, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P, Subramanian V, Tack-Goldman K, Gay WA Jr. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med.* 1983; 308:800-5.
- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol.* 2005; 131:208-13.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem.* 2005; 280: 22788-92.

## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare la Professoressa Maria Luigia Randi e il Professor Fabrizio Fabris per avermi permesso di lavorare a questo progetto e per avermi seguito in questi tre anni di Dottorato.*

*Un sincero GRAZIE a tutto il “laboratorio piastrine”, vere compagne di avventura! Grazie a Silvia, Pamela e Fabiana per aver contribuito attivamente alla stesura di questa tesi, senza di voi non sarebbe stato facile...*

*Grazie di cuore ai miei GENITORI e ad ANDREA che mi hanno sempre sostenuta ed incoraggiata in ogni mia scelta.*

*Nicole*