

UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla Biomedicina

Studio dell'over-espressione della proteina MRP4 (Multidrug Resistance Protein-4) in pazienti con sindrome coronarica acuta (SCA) in terapia cronica con acido acetilsalicilico

Relatori

Ch.mo Fabio M. Pulcinelli

Ch.ma Maria Franzini

Laureanda

Eleonora Schiera

Anno Accademico 2020/2021

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Piastrine e coinvolgimento cardiovascolare	1
1.1.1	Biogenesi piastrinica	1
1.1.2	Struttura piastrinica	2
1.1.3	Contenuto dei granuli piastrinici	4
1.1.4	Fasi della risposta piastrinica	5
1.1.5	Aggregazione piastrinica e formazione di coaguli piastrinici	7
1.1.6	Agonisti e antagonisti dell'aggregazione piastrinica	9
1.2	La terapia antiaggregante nella riduzione degli eventi cardiovascolari	10
1.2.1	L'Aspirina: la storia del farmaco	10
1.2.2	Meccanismo d'azione dell'aspirina	11
1.2.3	L'aspirina nella riduzione degli eventi cardiovascolari/ di sindrome coronarica acuta	13
1.3	Resistenza all'aspirina	15
1.3.1	L'adaptoma piastrinico e l'alta reattività piastrinica all'aspirina	15
1.4	MRP4 nella resistenza all'aspirina	17
1.4.1	Generalità e struttura	17
1.4.2	Funzione	19
1.4.3	Ruolo nella resistenza all'aspirina	21
2	Scopo della tesi	23

3	Materiali e metodi	26
3.1	Selezione dei pazienti	26
3.1.1	Criteri di esclusione	27
3.2	Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e plasma povero di piastrine (PPP)	27
3.3	Aggregazione piastrinica con aggregometro di Born	28
3.3.1	Preparazione di piastrine per estrazione e quantificazione proteica	29
3.4	Elettroforesi delle proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)	30
3.4.1	Preparazione dei campioni	30
3.5	Western blot	31
3.5.1	Trasferimento e incubazione con l'anticorpo primario e secondario	31
3.6	Analisi densitometrica dell'espressione proteica	32
3.7	ABCC4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (ELISA)	32
3.8	Metodi statistici	33
4	Risultati	34
4.1	Espressione di MRP4 in piastrine di pazienti in trattamento cronico con aspirina	34
4.2	Analisi dell'espressione di MRP4 in pazienti in trattamento cronico con aspirina	36
4.3	Kit ELISA per la quantizzazione di MRP4	39
5	Discussione	44
6	Conclusioni	46
6.1	Lavori futuri	49

Sommario

Risale al 1881 la scoperta delle piastrine da parte del patologo generale italiano G.Bizzozero, il quale attribuì alle piastrine l'importante ruolo nell'emostasi. Le piastrine sono tradizionalmente descritte come dei frammenti cellulari derivati dai megacariociti, a livello del midollo osseo, con funzione omeostatica vitale nella prevenzione di emorragia in seguito ad un danno dell'endotelio vascolare. Tuttavia, variazioni della risposta piastrinica a stimoli fisiologici o patologici possono predisporre ad un aumento del rischio di trombosi o di sanguinamento. Nell'ambito della prevenzione primaria e secondaria delle patologie cardiovascolari, come ad esempio l'infarto del miocardio, assume un ruolo fondamentale l'impiego farmacologico dell'acido acetilsalicilico e la sua efficacia è ben documentata. L'acido acetilsalicilico, commercialmente noto con il nome di aspirina, è un agente antiplastrinico inibente, in modo irreversibile, l'attività dell'enzima ciclossigenasi 1 (COX1). Tuttavia, pazienti in trattamento cronico con aspirina, possono progressivamente sviluppare un decremento di sensibilità nei confronti della stessa. La proteina-canale coinvolta nel metabolismo piastrinico dell'aspirina è il trasportatore MRP4, acronimo di "Multidrug Resistance Protein-4". MRP4/ABCC4 è un membro della sottofamiglia MRP/ABCC della famiglia dei trasportatori ATP-binding cassette (ABC), in grado di estrudere una grande varietà di componenti endogene e xenobiotici organici. L'induzione di questi trasportatori riduce la tossicità intracellulare derivante da anioni organici. Infatti, l'over-espressione della proteina MRP4 ha un ruolo nella riduzione dell'azione dell'aspirina. Nel presente progetto di tesi abbiamo analizzato le variazioni dell'espressione di MRP4 nelle seguenti popolazioni:

1. pazienti con eventi di NSTEMI in terapia cronica con Aspirina (75-150 mg/die) da almeno due mesi (SCA);
2. pazienti in terapia cronica con aspirina (75-150 mg/die) da almeno due mesi, in assenza di SCA, ma con una storia di malattia coronarica o che presentino uno o più fattori di rischio aterotrombotici (ASA)

3. Pazienti con dispositivo di supporto meccanico al circolo, in doppia terapia antiaggregante aspirina (100 mg/die) + Clopidogrel (VAD)
4. Pazienti con fattori di rischio e assunzione di farmaci simili a pazienti ASA, con la sola esclusione del trattamento con Aspirina (CTR)
5. Volontari sani, senza diagnosi di SCA e non in trattamento cronico con aspirina (HV)

Nelle piastrine di pazienti in terapia cronica con aspirina e diagnosi di SCA abbiamo riscontrato un aumento statisticamente significativo sia dell'espressione della proteina MRP4 che dell'mRNA a confronto con le altre popolazioni di pazienti. In aggiunta, abbiamo rivolto lo studio dell'overespressione della proteina MRP4 ad un'altra categoria di soggetti, pazienti con indebolimento cardiaco o con insufficienza cardiaca, a cui è stato impiantato un dispositivo di supporto meccanico al circolo, VAD (Ventricular Assist Device). I pazienti VAD sono stati confrontati con soggetti sani e con pazienti, non trattati con aspirina, ma con fattori di rischio simili e a supporto dei precedenti risultati abbiamo riscontrato un aumento statisticamente significativo dell'overespressione di MRP4 nei soggetti VAD rispetto ai volontari sani ed ai soggetti di controllo.

Abstract

Platelets discovery by Italian general pathologist G.Bizzozero, dates back to 1881, who attributed an important role in haemostasis to platelets. Platelets are treated as fragments cellular derived from megakaryocytes, at bone marrow level with homeostatic function in haemorrhage prevention following a vascular endothelium. However, changes in the platelet response to physiological or pathological stimuli may predispose to an increased risk of thrombosis or bleeding. In primary and secondary prevention of cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, the pharmacological use of acetylsalicylic acid plays a basic role and its effectiveness is well documented. Acetylsalicylic acid, known like Aspirin, is an antiplatelet agent inhibits irreversibly enzyme cyclooxygenase activity 1 (COX1). However, patients in chronic treatment may increase with a decrease in sensitivity towards the same. The protein-channel involved in aspirin platelet metabolism is MRP4 transporter, whose meaning is "Multidrug Resistance Protein-4". MRP4 / ABCC4 is subfamily member of the MRP / ABCC, of ATP-binding cassette (ABC) transporter family, able extruding a large variety of organic endogenous and xenobiotic components. These induction transporters reduces intracellular toxicity resulting from organic anions. Indeed, MRP4 protein over-expression plays a role in reducing aspirin action. In the present thesis project we study MRP4 variations expression and its mRNA in 4 populations:

- patients diagnosed with ACS on chronic aspirin therapy (75 mg/die) for at least two months (SCA)
- patients on chronic aspirin therapy (75 mg/die) for at least two months, in the absence of ACS (ASA)
- patients with a mechanical support device for the circulation, with double antiplatelet therapy Aspirin (100 mg/die) + Clopidogrel (VAD)
- patients with risk factors and drugs similar to patients on therapy, but not treated with aspirin (CTR)

- healthy subjects, without a diagnosis of ACS and not treated with chronic aspirin therapy (HV)

In patients platelet on chronic aspirin therapy and diagnosed with ACS, we found a statistically significant increase in both the expression MRP4 protein and mRNA compared with other patient populations. Furthermore we have addressed MRP4 overexpression protein study to other category of subjects, such as heart failure patients implanted with a mechanical support device for the circulation, VAD (Ventricular Assist Device). The VAD patients were compared with healthy subjects and with not aspirin treated patients, but with similar risk factors and in previous results support we founded a statistically significant increase in MRP4 overexpression in VAD subjects.

Capitolo 1

Introduzione

Le piastrine, o trombociti, sono frammenti plasmatici di una cellula progenitrice midollare multinucleata, il megacariocita. Le piastrine si formano attraverso il processo di trombopoiesi, o anche detto di piastrinopoiesi. La trombopoiesi viene regolata dal fattore ormonale presente nel siero trombopoietina, che è in grado di aumentare non solo la produzione di piastrine, ma anche la proliferazione dei megacariociti. In condizioni fisiologiche, le piastrine sono coinvolte nell'emostasi primaria ed in particolare nella fase detta "piastrinica", che culmina con la formazione del tappo piastrinico lì dove sia presente un danno vascolare¹. Le piastrine appena immesse in circolo sono più grandi ed hanno un'attività emostatica maggiore rispetto alle piastrine circolanti mature.

1.1 Piastrine e coinvolgimento cardiovascolare

1.1.1 Biogenesi piastrinica

Tutti i tipi cellulari derivano da cellule staminali ematopoietiche pluripotenti (hematopoietic stem cells, HSC), che risiedono principalmente nel midollo osseo, un importante sito di emopoiesi adulta². A partire dalle HSC si intraprendono diverse linee differenziative: la linea mieloide

¹Cfr. Michael Holinstat. Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(2):195–198, 2017

²Cfr. B Chantemargue, Florent Di Meo, K Berka, N Picard, H Arnion, M Essig, P Marquet, M Otyepka, and P Trouillas. Structural patterns of the human abcc4/mrp4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacological research*, 133:318–327, 2018.

e la linea linfoide, ciascuna delle quali origina diversi lignaggi cellulari³. In particolare, è la linea mieloide che dà origine ai precursori delle piastrine, oltre che a quelli per gli eritrociti ed i leucociti. Attraverso diversi stadi di maturazione, indotti da modifiche nell'espressione di molecole selettive per il controllo del destino cellulare, si ha la formazione dei precursori megacariocitici. I megacariociti sono cellule con diametro di 60-100 µm dai contorni irregolari e provvisti di molti pseudopodi^{4 5}. La produzione di piastrine avviene per frammentazione degli pseudopodi, tramite separazione del citoplasma granulare del megacariocito in piccole unità delimitate da membrana, che sono poi espulse come piastrine senza interrompere la continuità della membrana plasmatica. I megacariociti giacciono a ridosso dei seni vascolari del midollo, di modo che le piastrine neo formate possano essere immesse direttamente nel lume vascolare attraverso le aperture della parete del sinusoidale. Le piastrine appena immesse in circolo sono più grandi ed hanno un'attività emostatica maggiore rispetto alle piastrine circolanti mature. In un soggetto sano il loro numero varia da un minimo di 150.000 a 400.000/mm³ ed hanno un'emivita media di 5-6 giorni.

1.1.2 Struttura piastrinica

Le piastrine sono frammenti citoplasmatici, cellule secernenti senza nucleo con un diametro compreso fra 1 e 4 µm, spessore di 1 µm e un volume cellulare medio da 6 a 10 fL. La dimensione delle piastrine è correlata alla reattività piastrinica; le piastrine più grandi hanno un potenziale protrombotico maggiore. L'elevata dimensione delle piastrine (volume medio delle piastrine) è associata ad un aumento dell'aggregazione piastrinica, una maggiore espressione di molecole di adesione e un elevato rischio di malattie cardiovascolari e arteriose periferiche⁶. A partire dall'esterno, le piastrine sono rivestite da un glicocalice di 15-20 nm di spessore, co-

³Cfr. Michael A Rieger and Timm Schroeder. Hematopoiesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(12):a008250, 2012.

⁴Cfr. Kellie R Machlus and Joseph E Italiano. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. Journal of Cell Biology, 201(6):785–796, 2013.

⁵Cfr. H Schulze and RA Shivdasani. Mechanisms of thrombopoiesis. Journal of thrombosis and haemostasis, 3(8):1717–1724, 2005.

⁶Cfr. Bath and Butterworth, 1996 ; Kamath et al., 2001 ; Berger et al., 2010 ; Chu et al., 2010 ; Slavka et al., 2011)

stituito da glicoproteine, mucopolisaccaridi, glicolipidi e proteine, avendo ruolo di recettori e proteine adesive e costituendo perciò una struttura dinamica e il sito di primo contatto con l'ambiente vascolare circostante. Il glicocalice risulta inoltre caratterizzato dalla presenza di residui di acido sialico, associati alle proteine e ai lipidi, che grazie alla loro carica negativa minimizzano l'adesione fra le piastrine circolanti⁷⁸. Al di sotto di questa struttura, le piastrine possiedono una membrana plasmatica trilaminare con aspetto rugoso dato da porzioni in cui questa si introflette a formare un sistema di invaginazioni, che costituiscono il sistema canalicolare aperto (OCS), in diretta continuità con la membrana plasmatica e con l'ambiente esterno. Il sistema canalicolare aperto presenta delle zone di stretta associazione con un altro complesso di membrane che formano dei canalicoli chiusi, isolati dall'esterno, originati dal reticolo plasmatico dei megacariociti: il sistema tubulare denso (DTS). A livello di questo sistema si svolgono alcuni importanti meccanismi biochimici quali il metabolismo dell'acido arachidonico, dell'AMP-ciclico e del trasporto del calcio. Questo sistema, infatti, determina un aumento di superficie per gli scambi con l'esterno e, quindi, una rapida via di secrezione dei granuli al momento dell'attivazione piastrinica. La membrana piastrinica, inoltre, grazie alla presenza del fattore piastrinico 3, fosfolipide che fornisce la fase solida sulla quale avvengono le interazioni tra i fattori coagulativi quando la cascata è attiva, è caratterizzata da attività pro-coagulante. L'area sottomembrana delle piastrine è costituita dal citoscheletro contrattile di membrana, formato da microfilamenti contrattili di actina (10-20%) e miosina (15-20%) e da un fascio circonferenziale di microtubuli, con funzione di supporto dei microfilamenti di actina affinché venga mantenuta la forma discoidale delle piastrine. Le piastrine non attivate presentano una forma discoidale e vengono, per questo motivo, identificate come discociti. Il mantenimento della forma discoidale è controllato dal citoscheletro e in particolare dal fascio circonferenziale di 12 microtubuli e da microfilamenti contrattili ancorati alle membrane cellulari. Al momento della loro attivazione subiscono un cambiamento di forma diventando sferoidali, quindi dette sferociti. Inoltre, a parte l'assenza del nucleo, sono presenti tutti i principali componenti citoplasmatici subcellulari: mitocondri, corpi densi, α -granuli, lisosomi.

⁷Cfr. Thomas Gremmel, Andrew L Frelinger III, and Alan D Michelson. Platelet physiology. In Seminars in thrombosis and hemostasis, volume 42, pages 191–204. Thieme Medical Publishers, 2016.

⁸Cfr. Luca Masotti. Endothelial pathophysiology, glycosaminoglycans and glycocalyx. Clinical Management Issues, 4(4S):5–16, 2010.

1.1.3 Contenuto dei granuli piastrinici

Il citoplasma piastrinico è caratterizzato dalla presenza di tre tipi di granuli uniformemente distribuiti:

1. I granuli α rappresentano la tipologia prevalente. Risultano essere ovali o rotondeggianti con un diametro compreso tra i 200 ed i 500 nm. Il loro contenuto è eterogeneo. Tra le principali componenti contenute troviamo proteine per l'adesione piastrinica quali il fibrinogeno e la trombospodina (TP), molecole di adesione quali le selectine, in particolare le P-selectine, modulatori di crescita quali la fibronectina, il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), il fattore piastrinico 4 (PF4), e fattori per l'attivazione piastrinica, quale la β -tromboglobulina.
2. I granuli δ , o detti corpi densi, più piccoli, diametro compreso tra i 200-300 nm, rispetto ai granuli α e meno numerosi. Contengono principalmente i nucleotidi adenosina difosfato (ADP) e adenosina tri-fosfato (ATP), ammine vasoattive serotonina e adrenalina, ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} .
3. I granuli λ , o lisosomi, in piccole quantità e di dimensioni inferiori in rapporto ai granuli α . Contengono idrolasi acide coinvolte nel riassorbimento che avviene nelle fasi di lisi del trombo.

Il contenuto dei granuli è liberato nel plasma attraverso il sistema canalicolare, aperto durante il processo secretorio che segue l'attivazione⁹.

⁹Cfr. N Di Giorgio. Fenomeni di oncosi controllata nelle piastrine durante la stabilizzazione del coagulo indotto da stimolo immunologico. 2006.

1.1.4 Fasi della risposta piastrinica

In condizioni fisiologiche l'endotelio integro e la superficie piastrinica si respingono in virtù delle loro cariche negative. In seguito al danno vascolare, le piastrine sono esposte al sottoendotelio, cioè al collagene, ai proteoglicani, alla fibronectina e ad altre glicoproteine che ne determinano l'attivazione. La risposta piastrinica comporta variazioni di carattere morfologico, strutturale e biochimico delle piastrine stesse con il coinvolgimento simultaneo e coordinato della membrana, del citoscheletro e dei granuli.

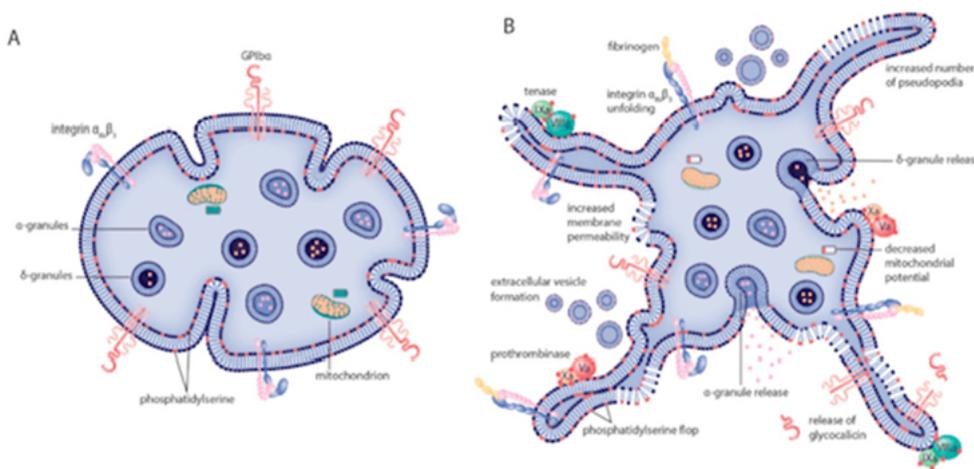


Figura 1.1: A) Piastrina inattiva. B) Piastrina attivata

La perdita dell'integrità endoteliale comporta il rilascio dai corpi di Weibel-Palade, contenuti all'interno delle cellule endoteliali, il fattore di Von-Willebrand (vWF) multimerico attivo che riveste il collagene esposto, fornendo un sito di legame per il recettore piastrinico non integrinico GpIb/IX/V. Il vWF in aggiunta al ruolo nella mediazione dell'adesione piastrinica, veicola nel sangue il fattore VIII della coagulazione.

Segue il legame con il collagene da parte del recettore piastrinico GpIa/GpIIa ($\alpha2/\beta1$) e del recettore, non integrinico, GpVI. Quest'ultimo legame viene inoltre stabilizzato dal legame della trombospondina al recettore GpVI. Avvenuta l'adesione al sottoendotelio, si innesca una cascata di segnali che culminano con il cambiamento di forma, detto "shape change", e con la secrezione del contenuto dei granuli. Lo shape change consiste in una rapida trasformazione delle piastrine circolanti da una forma discoidale ad una sferica irregolare, con pseudopodi, dapprima corti, poi sempre più lunghi, così da rendere possibile il contatto tra piastrine

vicine e conferendo un aspetto a sfera spinosa detto “spiny sphere” o definite anche come “echinociti”. In associazione ai fenomeni contrattili, alla base del cambiamento di forma, vi è anche il trasporto dei granuli vicino al sistema canalicolare aperto (centralizzazione dei granuli), fusione della membrana del granulo con quella del canalicolo e conseguenziale secrezione del contenuto. Durante l’attivazione vengono, in sequenza, attivati gli enzimi fosfolipasi-C (PLC) e fosfolipasi- A2 (PLA2), localizzati sul versante citoplasmatico della membrana piastrinica. L’enzima PLC porta alla conversione del fosfatidil-inositolo-2 (PIP2) di membrana in inositolo-trifosfato (IP3), per il quale sono presenti recettori sulla membrana di vescicole che costituiscono un deposito intra-piastrinico non mitocondriale di ioni Ca^{2+} che, una volta rilasciati nel citosol, portano all’attivazione della chinasi per le catene leggere della miosina (MLCK). Quest’ultima opera una reazione di fosforilazione, che permette l’interazione della miosina con l’actina e conseguente accorciamento delle strutture fibrillari e modificazione delle piastrine con liberazione granulare. In aggiunta, l’IP3 legandosi al diacilglicerolo porta all’attivazione della fosfochinasi-C (PK-C) che fosforila la proteina plekstrina, con funzione regolatoria della secrezione dei granuli. Tra le sostanze granulari rilasciate, l’ADP stimola l’attivazione della PLA-2 che, tramite catalisi idrolitica dei fosfolipidi di membrana, porta al rilascio di acido arachidonico (AA). L’acido arachidonico grazie all’attività ciclossigenasica e successivamente perossidasi dell’enzima COX porta alla formazione della prostaglandina H2 (PGH2), a sua volta processata a formare il trombossano A2 (TXA2) che rappresenta un forte segnale pro-aggregante.

1.1.5 Aggregazione piastrinica e formazione di coaguli piastrinici

L'aggregazione piastrinica si verifica grazie al legame del fibrinogeno con i recettori GpIIb/IIIa di piastrine adiacenti, portando alla formazione dell'aggregato detto "tappo bianco" formato solo dalle piastrine¹⁰. In condizioni di riposo, il complesso recettoriale si trova in forma inattiva in quanto le due glicoproteine IIb e IIIa risultano separate. In seguito a stimolazione da parte dei vari agonisti ed in presenza di ioni Ca^{2+} si ha la formazione del complesso eterodimerico attivo in grado di legare il fibrinogeno. Il cambiamento conformazionale del recettore GPIIb/IIIa ($\alpha 2b\beta 3$) porta all'aumento della sua affinità per il fibrinogeno e per il vWF ed il legame al vWF assicura un'adesione stabile alla parete endoteliale, mentre il legame al fibrinogeno facilita l'aggregazione piastrinica. Questa prima fase di aggregazione è di tipo reversibile ed è detta aggregazione primaria. L'aggregazione piastrinica è, infatti, un fenomeno bifasico e si può distinguere in aggregazione primaria e secondaria. La prima è un evento reversibile, indotto da piccole quantità di agonisti che interagiscono con i loro recettori sulla membrana piastrinica. Se lo stimolo che ha portato all'attivazione è stato debole o di breve durata, la piastrina riacquisisce in breve tempo la morfologia caratteristica dello stato di riposo. Le piastrine dopo una prima attivazione debole sono caratterizzate da un periodo di refrattarietà per il quale possono non rispondere ad un successivo stimolo nel breve termine. Nel caso in cui, invece, l'entità della stimolazione sia maggiore nell'intensità e nella durata, si ha il fenomeno dell'aggregazione secondaria. L'aggregazione secondaria è, invece, un evento irreversibile, dovuto sia al rilascio di notevoli quantità di agonisti ed alla loro interazione con i rispettivi recettori, sia al rilascio di grandi quantità di ADP e quindi di TXA₂. L'ADP, insieme alla serotonina, rilasciata dai corpi densi, coopera nell'attivazione di altre piastrine e nel coinvolgimento di ulteriori elementi coinvolti nell'aggregazione dando luogo al meccanismo di auto-amplificazione della risposta piastrinica. Inoltre, i segnali di aggregazione primaria che inducono lo shape change permettono l'esposizione a livello della membrana piastrinica del fattore piastrinico 3 (FP3). L'FP3 (fosfatidil-serina), infatti, si trova sul versante interno della membrana risultando inaccessibile. Lo shape change, inducendo un riassetto della membrana plasmatica, permette tramite

¹⁰Cfr. Kerstin Jurk and Beate E Kehrel. Platelets: physiology and biochemistry. In Seminars in thrombosis and hemostasis, volume 31, pages 381–392. Copyright©2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New . . . , 2005.

il meccanismo “flip-flop” l’esposizione di fosfatidil-serina. Le fosfatidil-serine costituiscono una superficie negativa per l’assemblaggio dei complessi multimolecolari per il processo di coagulazione. Inoltre, attraverso la via dell’inositolo trifosfato, sopra menzionato, si ha la liberazione del calcio dal sistema tubulare denso (riserva intracellulare) e quindi un influsso di calcio extracellulare che coopera nel meccanismo di auto-amplificazione dell’attivazione.

1.1.6 Agonisti e antagonisti dell'aggregazione piastrinica

Tutte le sostanze, ancorate ad una matrice o rilasciate in fase liquida, che hanno corrispondenti recettori sulle piastrine in grado di trasdurre, con i meccanismi prima descritti, sono capaci di indurre aggregazione piastrinica e vengono per questo definiti agonisti. L'attivazione piastrinica può verificarsi attraverso pathway diversi e cooperativi che sono indotti da agonisti quali l'adenosina difosfato (ADP), il trombossano A₂, la serotonina, l'epinefrina, e l'attivatore più potente rappresentato dalla trombina. La trombina risulta essere l'agonista più potente in quanto è in grado di attivare le piastrine a concentrazioni di molto inferiori rispetto a quelle necessarie per l'attivazione della cascata coagulativa. I recettori coinvolti nell'attivazione piastrinica ad opera della trombina sono il recettore PAR-1 e PAR-4. PAR-1 esercita un ruolo prominente aiutando l'aggregazione, il rilascio della serotonina e dell'epinefrina, e anche l'attivazione dell'attività procoagulante attraverso le P-selectine e CD40. L'ADP viene accumulata nei granuli densi ed è rilasciata quando le piastrine sono attivate. I recettori dell'ADP (P2Y₁ and P2Y₁₂) sono localizzati sulla membrana piastrinica e una volta attivati determinano lo shape change e l'aggregazione (Mia-Jeanne van Rooy 2014). Nello specifico, P2Y₁ è responsabile del cambiamento di forma, dell'aggregazione reversibile e in associazione a P2Y₁₂ induce il rilascio di trombossano A₂. Inoltre, P2Y₁₂ è specificatamente coinvolto nel reclutamento delle piastrine e nell'attivazione della cascata coagulativa. La sua azione è favorita e rafforzata dall'adrenalina (Jennings LK. 2009). Il trombossano A₂, agendo attraverso l'attivazione del proprio recettore (TP α and TP β) aiuta il reclutamento di nuove piastrine per il tappo piastrinico in formazione, aumentandone anche l'aderenza. Il trombossano si origina per conversione dell'acido arachidonico ad opera dell'enzima ciclo-ossigenasi e trombossano sintasi (Jennings LK 2009). La serotonina, invece, legandosi al recettore serotoninergico 5HT-2 coopera nel reclutamento piastrinico e al cambiamento di forma. Le sostanze che, invece, si oppongono e inibiscono l'aggregazione sono dette antagonisti. Tutti gli antagonisti possiedono recettori piastrinici associati a proteine G_s , ossia stimolatrici o dell'adenilato ciclasi di membrana, quali la prostaciclina (PGI₂) di derivazione endoteliale, la prostaglandina D_2 , l'adenosina e l'adrenalina, o stimolatrici della guanilato ciclasi, quali l'ossido nitrico (NO), anch'esso di derivazione endoteliale, il cui aumento provoca inibizione dell'aggregazione. Tutti gli antagonisti

dell'aggregazione piastrinica, compresi la PGI₂ e l'NO, estrinsecano la loro azione portando ad un innalzamento dei livelli dei nucleotidi ciclici intra-piastrinici. L'azione inibitoria preponderante è esercitata dal cAMP, poiché esercita effetti inibitori pleiotropici bloccando sia l'innescamento sia il mantenimento delle risposte stimolatorie l'aggregazione. Esso, infatti, non permette il legame degli agonisti ai loro recettori, inibisce la protein-chinasi C (PK-C) e contrasta le risposte indotte dagli ioni calcio, inclusa l'idrolisi dell'acido arachidonico ad opera della fosfolipasi A₂.

1.2 La terapia antiaggregante nella riduzione degli eventi cardiovascolari

Le piastrine assumono un ruolo essenziale nella patogenesi degli eventi aterotrombotici, giustificando l'uso di agenti antiplastrinici nella loro prevenzione. Gli antiaggreganti piastrinici sono farmaci antitrombotici che tramite la loro azione interferiscono con alcune fasi del processo trombotico.

1.2.1 L'Aspirina: la storia del farmaco

L'aspirina è tra i farmaci antiaggreganti più usati ed appartiene alla classe dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), della famiglia dei salicilati. Il principio attivo dell'aspirina è l'acido acetilsalicilico (ASA) (acido 2-acetossibenzoico) un composto derivato dalla pianta del salice. Già tra gli antichi egizi, greci e romani erano note le potenzialità curative derivanti dall'estratto delle foglie del salice. A partire dai primi anni dell'800 si iniziò ad isolare e ad estrarre, dalla corteccia di salice, quantità pure e maggiori di "salicina", così chiamata inizialmente da Johann Buchner. Nel 1838, il chimico italiano Raffaele Piria fu in grado di scindere la salicina in un composto aromatico chiamato aldeide salicilica ed uno zucchero e a questo punto poté trasformarla chimicamente in un preparato più puro, cioè l'acido salicilico. Nel 1853, il chimico francese Charles Frederic Gerhardt produsse l'acido acetilsalicilico. Tuttavia, il suo lavoro non venne preso in considerazione.

Fu Felix Hoffman, chimico tedesco, che nel 1897 riuscì a trovare la formulazione per ottene-

re un composto efficace e tollerabile, grazie alla combinazione di acido salicilico con acido acetico, risultanti in un composto puro e stabile. Inoltre, intorno alla metà del XVIII secolo i medici somministravano salicina e acido salicilico ottenendo validi risultati nella cura di alcune condizioni dolorose come la gotta, l'artrite, la febbre tifoidea e la febbre reumatica. Tuttavia, emersero degli effetti avversi dati dall'assunzione della salicina, quali emorragie, ma anche irritazione gastrica ed ulcere allo stomaco. Dopo la seconda guerra mondiale, nel 1948, anche il dottor Lawrence Craven, un medico generico e otorinolaringoiatra californiano, notò che i pazienti che avevano fatto un largo uso di aspirina sviluppavano emorragie e per questo motivo ipotizzò che l'aspirina potesse interferire con la capacità di coagulazione del sangue. Questa ipotesi fu la spinta per la sperimentazione dell'azione antitrombotica dell'aspirina e infatti, in seguito ad un follow-up della durata di molti anni, registrò un importante calo sia di casi di infarto sia di ictus.

1.2.2 Meccanismo d'azione dell'aspirina

L'aspirina, somministrata per via orale, esercita azione antitrombotica. A basse dosi (40-325 mg/die) l'azione dell'ASA si estrinseca a livello piastrinico; mentre a livello dell'endotelio vascolare, a dosi maggiori di 325 mg/die, l'ASA inibisce la sintesi da parte della ciclossigenasi-2 (COX-2) di prostaciclina PGG₂, antagonista del trombossano. L'ASA agisce, a livello molecolare, inibendo l'attività dell'enzima ciclossigenasi-1 (COX-1), isoforma piastrinica, operando una acetilazione irreversibile della serina 529, comportando così un ingombro sterico che non permette il legame dell'acido arachidonico al sito catalitico dell'enzima e quindi la conversione in PGG₂¹¹.

L'inattivazione dell'enzima, in definitiva, si esplica nell'arresto della produzione dei mediatori fisiologicamente prodotti, tra cui il trombossano-A₂ (TXA₂), potente aggregante piastrinico. Dal momento che le piastrine sono dei frammenti citoplasmatici privi di nucleo e quindi incapaci di risintetizzare l'enzima, il blocco dell'aggregazione permane per l'intera emivita piastrinica. Il ripristino avviene quindi solo con una nuova sintesi dell'enzima. Le COX, attraverso reazioni di ciclizzazione e perossidazione, normalmente trasformano l'acido arachidonico in

¹¹DMM Fornasari and Pierangelo Lora Aprile. Dolore infiammatorio acuto in pazientia rischio cardiovascolare in terapia con aspirina a basse dosi: una possibile opzione e un'ipotesi suggestiva. Rivista SIMG, 5:56-64, 2017.

PGH₂, un intermedio molto instabile, che ad opera di isomerasi e sintasi tessuto-specifiche, viene poi convertito in tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandine (PGE₂, PGD₂, PGF₂α). È importante sottolineare che la relazione tra inibizione della COX-1 piastrinica e ridotta produzione di TXA₂ non è lineare: è necessario infatti inibire più del 97% della COX-1 piastrinica per ottenere una riduzione della sintesi di TXA₂ clinicamente significativa, cioè superiore al 95%. Al di sotto di questo valore del 97%, l'inibizione della COX-1 non produce effetti sulla sintesi del TXA₂.

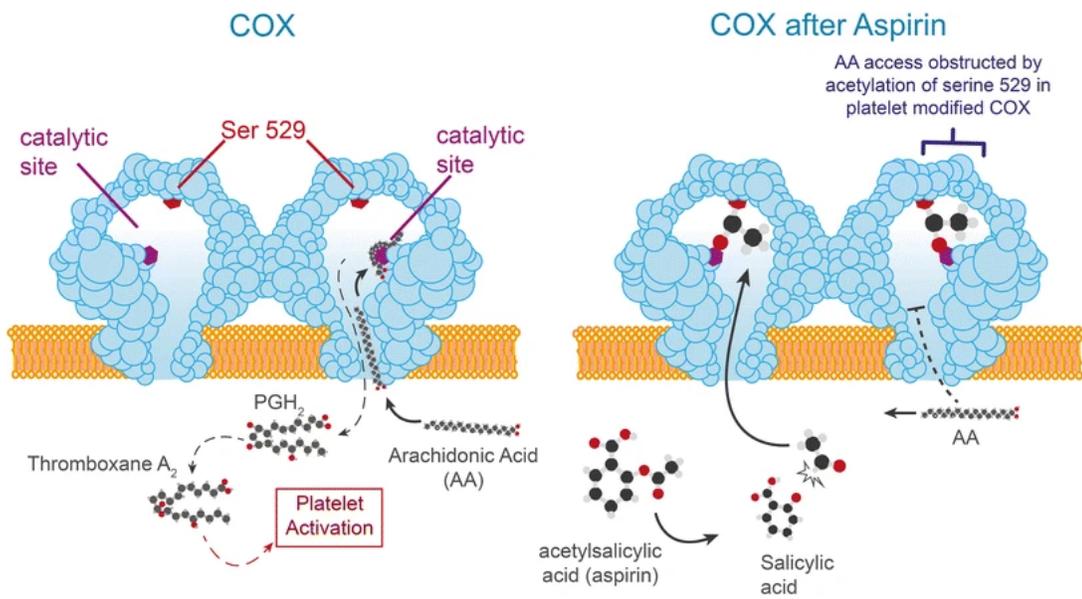


Figura 1.2: Meccanismo d'inibizione dell'enzima COX ad opera dell'aspirina

1.2.3 L'aspirina nella riduzione degli eventi cardiovascolari/ di sindrome coronarica acuta

Per sindrome coronarica acuta (SCA) si intende un insieme di diverse manifestazioni cliniche causate da ischemia miocardica acuta, o meglio delle patologie delle arterie coronarie, cioè dovute alla riduzione del flusso ematico a livello del tessuto cardiaco. In altri termini, si tratta della cosiddetta cardiopatia ischemica (Ischemic Heart Disease, IHD), che comprende appunto sindromi differenti, seppur altamente correlate, causate dall'ischemia del miocardio. La cardiopatia ischemica è, infatti, anche indicata come sinonimo di coronaropatia (Coronary Artery Disease, CAD). All'origine della riduzione del flusso vi è la rottura di una placca aterosclerotica (placca vulnerabile), come conseguenza di una già presente, ma silente, aterosclerosi coronarica cronica. In rari casi, la cardiopatia ischemica è determinata da:

- Aumentato fabbisogno, come ad esempio l'aumento della frequenza cardiaca o a causa di ipertensione;
- Ipovolemia, dovuta a ipotensione o a shock di vario genere;
- Efficienza nel trasporto di ossigeno, per esempio a causa di anemia.

La coronaropatia aterosclerotica è quindi un processo che si evolve nel tempo con l'evoluzione e la progressione della placca aterosclerotica nell'arco di decenni. La placca aterosclerotica origina dalla deposizione di lipidi, prevalentemente colesterolo e ed esteri del colesterolo, con conseguente ispessimento della parete arteriosa. Essendo le arterie le sedi maggiormente interessate dalla deposizione, la manifestazione clinica è quella dell'ischemia. Se l'evento ischemico interessa le coronarie avremo un infarto, mentre se interessa i vasi cerebrali avremo un ictus, ma ci sono anche altre manifestazioni minori. In particolare, le placche che determinano sindromi coronariche e infarto del miocardio risultano essere per lo più asintomatiche prima dell'evento trombotico, definendo le cosiddette "placche stabili" caratterizzate principalmente da core ateromatosa di trascurabile entità ed infiammazione minima. In seguito alla rottura della placca il sangue in circolo vi entra in contatto attivando i processi di coagulazione e quindi l'attivazione piastrinica con innesco di trombosi e, perciò, conseguente sindrome coronarica acuta. Qualora il sito interessato da occlusione sia un vaso epicardico, completamente

occluso, dopo un breve lasso temporale si avrà un infarto acuto del miocardio. Le sindromi coronariche acute possono essere classificate in diversi quadri clinici sulla base della durata dell'occlusione e della sua entità ed anche in base alle alterazioni elettrocardiografiche. Sulla base di quest'ultime distinguiamo due classificazioni:

- I. Sopraslivellamento del tratto-ST (STEMI, ST Elevation Myocardial Infarction) causato da un'occlusione coronarica parziale o intermittente. L'ECG presenta un sopraslivellamento del tratto ST al di sopra di 1mm ($ST > 1\text{mm}$).
- II. Non sopraslivellamento del tratto-ST (NSTEMI, Non ST-segment Elevation Myocardial Infarction). L'ECG, in questo caso, presenta un sottoslivellamento del tratto ST al di sotto di 1mm ($ST < 1\text{mm}$).

Entrambi i quadri clinici possono essere inoltre caratterizzati da una condizione di necrosi cellulare, da cui conseguono variazioni delle concentrazioni ematiche di biomarcatori. Tra questi troviamo la troponina, un marcatore cardiaco specifico e molto sensibile che nei casi di infarto si vede aumentato in particolar modo nell'isoforma T. Un altro marcatore è l'isoforma CK-MB dell'enzima creatina-cinasi (CK) indice di necrosi cardiaca; la lattato-deidrogenasi (LDH), predittiva di infarto miocardico ed infine l'alanina-transaminasi (ALT) e l'aspartato-transaminasi (AST). In generale, la loro rilevazione ematica è indice di danno cardiaco. In questo studio il quadro clinico di interesse risulta essere quello dell'infarto miocardico acuto senza sopraslivellamento del tratto ST: è causato da ischemia miocardica acuta associata a necrosi, con livelli del biomarcatore troponina elevati. E', inoltre, il quadro di infarto meno grave. In questi casi il trattamento con aspirina rappresenta il cardine terapeutico dal momento che l'attivazione piastrinica svolge un ruolo preponderante nella formazione del trombo¹². L'efficacia clinica e la sicurezza dell'aspirina quando prescritta per la prevenzione secondaria è supportata da una solida base di prove che dimostra una riduzione del 24% della mortalità e una riduzione del 25%

¹²Cfr. Hesham K Abdelaziz, Marwan Saad, Naga Venkata K Pothineni, Michael Megaly, RahulPotluri, Mohammed Saleh, David Lai Chin Kon, David H Roberts, Deepak L Bha, Herbert D Aronow, et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events, *Journal of the American College of Cardiology*, 73(23):2915–2929, 2019.

degli eventi avversi gravi senza alcun aumento delle complicanze emorragiche nel contesto di un infarto miocardico acuto¹³.

1.3 Resistenza all'aspirina

L'esposizione di cellule eucariotiche a farmaci può indurre variazioni transienti nell'espressione di meccanismi suscettibili a favorirne l'eliminazione. Nonostante sia ben documentata l'efficacia dell'aspirina nella prevenzione primaria e secondaria degli eventi CV, alcuni soggetti in terapia sviluppano nuovi eventi CV.

1.3.1 L'adaptoma piastrinico e l'alta reattività piastrinica all'aspirina

Le piastrine, seppur prive di nucleo, possono essere soggette a variazioni dell'espressione genica che inducono una ridotta sensibilità nei confronti dei trattamenti farmacologici. Le variazioni sono associate all'azione dei farmaci stessi sull'espressione genica nei megacariociti, che trasducono i segnali alle piastrine circolanti. Questo fenomeno ha un ruolo nella preservazione dell'abilità di risposta delle piastrine nel processo emostatico¹⁴¹⁵.

A tal proposito, l'aspirina è in grado di influenzare l'espressione genica dei megacariociti, in particolare inducendo l'over-espressione della proteina MRP4. Il ruolo della proteina canale MRP4 è duplice: favorisce sia l'eliminazione di farmaci, sia l'aumento della sensibilità piastrinica a pathway paralleli a quelli inibiti dall'aspirina. L'elevata reattività piastrinica all'aspirina, fenomeno anche noto con l'acronimo inglese di HARPR (High on-Aspirin Residual Platelet Reactivity), consiste in un'inibizione incompleta ed insufficiente dell'attivazione piastrinica,

¹³Cfr. Nazish Khan, Mamas A Mamas, Alexandra Moss, Diana A Gorog, Peter Nightingale, Angel Armesilla, Andrew Smallwood, Shahzad Munir, Saib Khogali, Ben Wrigley, et al. Aspirin related platelet reactivity as a determinant of ten year survival in high risk non-stsegment elevation myocardial infarction (nSTEMI) patients. *Thrombosis research*, 196:523–525, 2020.

¹⁴Cfr. M Cattaneo. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *Journal of thrombosis and Haemostasis*, 5:230–237, 2007.

¹⁵Cfr. Anne Zufferey, Pierre Fontana, Jean-Luc Reny, Severine Nolli, and Jean-Charles Sanchez. Platelet proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 31(2):331–351, 2012.

che si traduce quindi in una diminuita reattività alla terapia antiplastrinica¹⁶.

Questa riduzione nell'efficacia terapeutica viene quindi associata all'incremento del rischio di eventi ischemici. Il fenomeno dell'HARPR è di origine multifattoriale e tra le principali cause possono essere annoverati i fattori genetici^{17,18}. Tra le variazioni genetiche, prima di tutto, vi sono i cambiamenti nel gene codificante la COX-1 (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) che possono portare a modificazioni del sito attivo per il legame dell'aspirina, con incapacità di questa di legarsi all'enzima e di operarne perciò l'inattivazione. E' stato stimato che anche altri fattori quali l'infiammazione cronica e lo stress ossidativo, sono in grado di indurre alterazioni nella risposta all'aspirina. Le citochine che vengono prodotte durante il processo infiammatorio possono indurre l'attivazione della COX-2 che porta all'attivazione del trombossano-A2 in maniera indipendente dal pathway dell'acido arachidonico. Quindi, la produzione di catecolamine e lo stress ossidativo possono attivare in maniera diretta piastrine non sensibili all'aspirina¹⁹.

Un altro importante fattore è il fumo di sigaretta, in quanto porta all'aumento della reattività piastrinica e diminuisce l'inibizione della biosintesi del trombossano-A2, che concorre al calo dell'azione dell'aspirina [20]. In aggiunta anche le alterazioni farmacodinamiche, cioè l'interazione dell'aspirina con altri farmaci, quali alcuni FANS, come ad esempio l'ibuprofene, concorrono al fenomeno dell'HARPR portando ad una ridotta efficacia del farmaco. Nel 2001 Catella-Lawson e collaboratori hanno dimostrato che l'assunzione di ibuprofene due ore prima dell'aspirina blocca l'azione di quest'ultima sulla COX-1 e quindi i suoi effetti sull'aggre-

¹⁶Cfr. Alf-Ager Pettersen, Ingebjørg Seljeflot, Michael Abdelnoor, and Harald Arnesen. High-on-aspirin platelet reactivity and clinical outcome in patients with stable coronary artery disease: results from ASCENT (aspirin nonresponsiveness and clopidogrel endpoint trial). *Journal of the American Heart Association*, 1(3):e000703, 2012.

¹⁷Cfr. Fabio M Pulcinelli, Teresa Maltese, and Flavia Temperilli. Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio.

¹⁸Cfr. JW Zhang, WW Liu, Timothy A McCaffrey, XQ He, WY Liang, XH Chen, XR Feng, Sidney W Fu, and ML Liu. Predictors of high on-aspirin platelet reactivity in elderly patients with coronary artery disease. *Clinical Interventions in Aging*, 12:1271, 2017.

¹⁹Cfr. Cristina Barale, Franco Cavalot, Chiara Frascaroli, Katia Bonomo, Alessandro Moroi, Angelo Guerrasio, and Isabella Russo. Association between high on-aspirin platelet reactivity and reduced superoxide dismutase activity in patients affected by type 2 diabetes mellitus or primary hypercholesterolemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14):4983, 2020.

gazione piastrinica. Questo è spiegato dal fatto che i FANS diversi dall'aspirina sono inibitori competitivi e reversibili del sito catalitico dell'enzima, perciò il loro legame impedisce quello dell'aspirina e da ciò consegue la mancata efficacia antiaggregante dell'aspirina²⁰²¹. Questo fenomeno è stato chiamato "resistenza clinica", e per ragioni non chiare è stato riservato in particolare al trattamento con aspirina, ma dovrebbe essere più propriamente definito "fallimento del trattamento".

1.4 MRP4 nella resistenza all'aspirina

Le piastrine, come ogni citotipo, sono caratterizzate dalla presenza di trasportatori di membrana. I trasportatori di membrana sono essenziali per la funzionalità cellulare, in quanto non tutti i composti sono in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica. Al fine della funzionalità piastrinica, assume un ruolo importante il trasportatore Abcc4 o MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4).

1.4.1 Generalità e struttura

I trasportatori ABC (ATPasi Binding Cassette) sono una famiglia di circa 48 proteine di membrana (suddivise in 7 sottofamiglie: A, B, C, D, E, F, G), sulla base della Human Genome Organization (HUGO), che presentano omologia di struttura e membrana ed il cui funzionamento dipende dall'utilizzo di molecole di ATP. La maggior parte di questi trasportatori hanno un peso molecolare che varia tra i 170 ed i 190 kDa. Dal punto di vista strutturale un trasportatore ABC è, generalmente, costituito da due siti di legame per l'ATP (ATP-binding domains o detti NBF= Nucleotide Binding Folds), sul versante citoplasmatico, e due domini transmembrana (TM), costituiti da 6 α -eliche transmembrana nel caso di un "trasportatore completo" (full transporters). Gli NBF contengono tre domini conservati: "Walker A e Walker B domains", che si ritrovano in tutti gli NBF, e domini specifici (domini C) localizzati a monte

²⁰Cfr. M Cattaneo. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5:230–237, 2007.

²¹Cfr. B Chantemargue, Florent Di Meo, K Berka, N Picard, H Arnion, M Essig, P Marquet, M Otyepka, and P Trouillas. Structural patterns of the human abcc4/mrp4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacological research*, 133:318–327, 2018.

del Walker B domain. Il trasporto di molecole e composti è unidirezionale, tipicamente dal versante citoplasmatico all'esterno della cellula. La sottofamiglia ABCC è costituita da 12 trasportatori completi, che mediano la secrezione di xenobiotici, il trasporto di ioni, riducendo la tossicità intracellulare derivante da anioni organici, e, sono anche coinvolti in meccanismi di trasduzione del segnale. A questa sottofamiglia appartiene il trasportatore MRP4 (Multidrug resistance protein, MRP, geni MRP)²². La proteina multiresistenza MRP4 (MRP4/ABCC4) è costituita da 1,325 aminoacidi, codificati dal gene ABCC4, che costituiscono un unico polipeptide N-glicosilato²³.

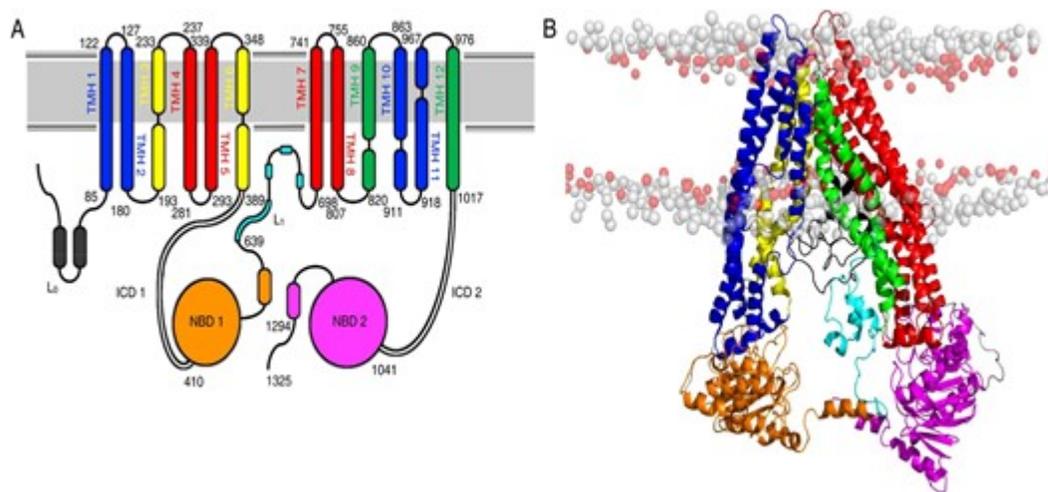


Figura 1.3: A) Topologia del trasportatore umano MRP4, evidenziando: i due TMD composti da 12 TMH (TMH 1-12); i due NBD (NBD 1 e 2); i due ICD (ICD 1 e 2), il linker L1; le eliche della cerniera; il motivo L0. B) Struttura 3D completamente rilassata del modello molecolare WT MRP4.

Il gene ABCC4 è caratterizzato da elevato polimorfismo, dal momento che sono stati identificati oltre 20 polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs), seppur non sia stato ancora chiarito come questi incidano sull'espressione del gene e conseguentemente sulla funzionalità della proteina²⁴.

²²Cfr. Jyh-Yeuan Lee and Daniel M Rosenbaum. Transporters revealed. *Cell*, 168(6):951–953, 2017.

²³Cfr. David Hardy, Roslyn M Bill, Anass Jawhari, and Alice J Rothnie. Functional expression of multidrug resistance protein 4 mrp4/abcc4. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, 24(10):1000–1008, 2019.

²⁴Cfr. B Chantemargue, Florent Di Meo, K Berka, N Picard, H Arnion, M Essig, P Marquet, M Otyepka, and P Trouillas. Structural patterns of the human abcc4/mrp4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacological research*, 133:318–327, 2018.

Tramite l'analisi dell'mRNA ed un'analisi di spettrometria di massa di MRP4 nelle piastrine è stato determinato il peso della glicoproteina piastrinica, che corrisponde a 190 kDa. La proteina MRP4 ha la tipica struttura di un trasportatore ABC, risultando infatti costituito da domini TM, in particolare 12, ciascuno formato da 6 eliche transmembrana (THM), che sono importanti per il legame del ligando, e da due domini NBD che legano e idrolizzano l'ATP per guidare il trasporto. Si trova, inoltre, espresso nella maggior parte dei tessuti umani, inclusi reni, cervello, fegato, pancreas, ghiandole surrenali, eritrociti e piastrine²⁵.

1.4.2 Funzione

La proteina canale MRP4, come già menzionato in precedenza, assolve la funzione di pompa di anioni organici. Infatti, è in grado di estrarre una grande varietà di componenti endogene come eicosanoidi, acidi biliari, urato e ormoni steroidei coniugati, e xenobiotici organici ed è anche in grado di mediare il trasporto di nucleotidi ciclici e analoghi di nucleotidi²⁶.

Il trasporto degli analoghi di nucleotidi può causare resistenza ai nucleosidi ed anche agli analoghi dei nucleotidi usati in clinica, come è stato osservato su diversi modelli cellulari sovraespressanti tali trasportatori. In piastrine normali, la proteina MRP4 è principalmente presente sulla membrana di granuli densi avendo un ruolo nell'influsso ed efflusso di ADP dagli stessi^{27,28}.

Si ritrova, inoltre, sulla membrana plasmatica delle piastrine stesse dove assume un impor-

²⁵Cfr. Michael Dean, Yannick Hamon, and Giovanna Chimini. The human atp-binding cassette(abc) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7):1007–1017, 2001.

²⁶Cfr. Christoph A Ritter, Gabriele Jedlitschky, Henriette Meyer zu Schwabedissen, Markus Grube, Kathleen Kock, and Heyo K Kroemer. Cellular export of drugs and signaling molecules by the atp-binding cassette transporters mrp4 (abcc4) and mrp5 (abcc5). *Drug metabolism reviews*, 37(1):253–278, 2005.

²⁷Cfr. Gabriele Jedlitschky, Konstanze Tirschmann, Lena E Lubenow, Hendrik K Nieuwenhuis, Jan WN Akkerman, Andreas Greinacher, and Heyo K Kroemer. The nucleotide transporter mrp4 (abcc4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood*, 104(12):3603–3610, 2004.

²⁸Cfr. Lena Oevermann, Jan Scheitz, Katharina Starke, Kathleen Kock, Thomas Kiefer, Gottfried Dolken, Juliane Nießen, Andreas Greinacher, Werner Siegmund, Marek Zygmunt, et al. Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of mrp4 (abcc4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *International journal of cancer*, 124(10):2303–2311, 2009.

tante ruolo anche nell'attivazione, dal momento che opera l'estrusione dei nucleotidi AMPc e GMPc, con effetto inibendo l'attivazione delle piastrine. Infatti, è stato dimostrato come in vivo l'inibizione di MRP4 previene la formazione di trombi con l'aumento dei livelli intracellulari dei nucleotidi AMPc e GMPc, mentre, in vitro, riduce l'attivazione piastrinica (Lien LM et al., 2014). Il ruolo di MRP4 nell'attivazione piastrinica è ulteriormente supportato da modelli di topi knock-out per MRP4 (MRP4^{-/-}) che presentano un'attivazione piastrinica difettosa indotta da collagene, che comporta un tempo di sanguinamento prolungato.²⁹.

La proteina MRP4 risulta essere anche in grado di estrarre l'aspirina dal versante citosolico all'esterno della cellula, con conseguente riduzione dell'acetilazione dell'enzima COX-1³⁰.

Tuttavia, non ancora risultano compresi il meccanismo ed i ruoli del trasportatore. Ciò origina sia da insufficienti informazioni dettagliate circa la struttura tridimensionale e ancor di più dalla complessità delle interazioni esistenti tra l'MRP4 e le molecole con cui interagisce [18]. Infatti, vi sono delle evidenze relative alla presenza di numerosi siti di regolazione allosterica che ne influenzano l'attività sia positivamente che negativamente.

²⁹Cfr. Satish B Cheepala, Aaron Pitre, Yu Fukuda, Kazumasa Takenaka, Yuanyuan Zhang, Yao Wang, Sharon Frase, Tamara Pestina, T Kent Gartner, Carl Jackson, et al. The abcc4 membrane transporter modulates platelet aggregation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(20):2307–2319, 2015.

³⁰Cfr. Teresa Mattiello, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Elisabetta Trifirò, Maria Pia Felli, Alessandro Barbarulo, Bruna Pucci, Paola Gazzaniga, Carlo Gaudio, Luigi Frati, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(7):752–761, 2011.

1.4.3 Ruolo nella resistenza all'aspirina

Il meccanismo per cui, una bassa percentuale di soggetti a cui è somministrata l'aspirina, non si ha risposta appropriata al farmaco è noto come "resistenza all'aspirina", seppur sia più appropriato parlare di mancata inibizione della funzione piastrinica³¹³².

L'aspirina è un substrato per il trasportatore MRP4, che è in grado di estruderla dalle cellule. Inoltre, come già menzionato, l'esposizione di cellule eucariotiche all'aspirina può portare ad innalzare l'espressione di MRP4³³.

La capacità di modulare l'espressione piastrinica di MRP4 è stata dimostrata in vitro con la linea cellulare megacarioblastica (DAMI cells), in megacariociti umani e in piastrine derivanti³⁴. È stato visto che, anche in vivo, la somministrazione di dosi di 100 mg/die sono sufficienti a determinare l'overespressione di MRP4 sia in volontari sani che in pazienti in trattamento cronico con aspirina³⁵³⁶³⁷

³¹Cfr. Christopher N Floyd and Albert Ferro. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacology therapeutics*, 141(1):69–78, 2014.

³²Cfr. DMM Fornasari and Pierangelo Lora Aprile. Dolore infiammatorio acuto in pazientia rischio cardiovascolare in terapia con aspirina a basse dosi: una possibile opzione e un'ipotesi suggestiva. *Rivista SIMG*, 5:56–64, 2017.

³³Cfr. Isabella Massimi, Ambra Ciuffetta, Flavia Temperilli, Francesca Ferrandino, Alessandra Zicari, Fabio M Pulcinelli, and Maria Pia Felli. Multidrug resistance protein-4 influences aspirin toxicity in human cell line. *Mediators of inflammation*, 2015, 2015.

³⁴Cfr. Jyh-Yeuan Lee and Daniel M Rosenbaum. Transporters revealed. *Cell*, 168(6):951–953, 2017.

³⁵Cfr. Li-Ming Lien, Zhih-Cherng Chen, Chi-Li Chung, Ting-Lin Yen, Hou-Chang Chiu, Duen-Suey Chou, Shih-Yi Huang, Joen-Rong Sheu, Wan-Jung Lu, and Kuan-Hung Lin. Multi-drug resistance protein 4 (mrp4/abcc4) regulates thrombus formation in vitro and in vivo. *European journal of pharmacology*, 737:159–167, 2014.

³⁶Cfr. Isabella Massimi, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, Carlo Gaudio, Marco Gabbianelli, Luigi Frati, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6):1343–1353, 2014.

³⁷Cfr. Isabella Massimi, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Simone Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, and Fabio M Pulcinelli. Enhanced platelet mrp4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment. *Thrombosis and haemostasis*, 116(12):1100–1110, 2016.

Recentemente, è stato anche dimostrato che l'over-espressione di MRP4 induce l'HARPR³⁸³⁹. In aggiunta, altri lavori hanno messo in evidenza che in alcuni pazienti in trattamento cronico con aspirina, dopo un'iniziale inibizione dell'aggregazione, hanno visto un recupero nell'attivazione piastrinica. Sin dal 1983, precedenti studi hanno provato la riduzione degli effetti dell'aspirina sull'aggregazione ADP-indotta nel tempo. In uno studio condotto tramite somministrazioni di dosi multiple di aspirina si è visto che l'aggregazione ADP-indotta, dopo la somministrazione di aspirina (20 mg/die) per la durata di una settimana veniva ridotta; mentre dopo 7-8 settimane (1,300-2,600 mg/die, rispettivamente) ritornava a livello basale nonostante l'inibizione della sintesi di trombossano-A₂.⁴⁰ In seguito a terapia con aspirina è, infatti, emersa una graduale inibizione dell'attivazione sull'aggregazione ADP-indotta. Inoltre, si è visto che l'iperattivazione piastrinica da ADP può essere predittiva di eventi cardiovascolari. La sovraespressione di MRP4 si pensa, quindi, possa contribuire all'attivazione piastrinica, in aggiunta all'effetto che esercita sulla COX-1, come già menzionato nel precedente paragrafo. Infatti, agisce da regolatore negativo operando l'estrusione dei nucleotidi AMPc e GMPc, con effetto inibente l'attivazione delle piastrine. Per questo motivo, il trasporto dei nucleotidi ciclici mediato da MRP4 è stato suggerito come potenziale nuovo target terapeutico ai fini dell'inibizione⁴¹.

³⁸Cfr. Isabella Massimi, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, Carlo Gaudio, Marco Gabbianelli, Luigi Frati, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6):1343–1353, 2014.

³⁹Cfr. Isabella Massimi, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Simone Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, and Fabio M Pulcinelli. Enhanced platelet mrp4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment. *Thrombosis and haemostasis*, 116(12):1100–1110, 2016.

⁴⁰Cfr. GARRET A FitzGerald, JOHN A Oates, JACEK Hawiger, RICHARD L Maas, L Jackson Roberts, JA Lawson, AR Brash, et al. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *The Journal of clinical investigation*, 71(3):676–688, 1983.

⁴¹Cfr. Alessandra Borgognone and Fabio Maria Pulcinelli. Reduction of camp and cgmp inhibitory effects in human platelets by mrp4-mediated transport. *Thrombosis and haemostasis*, 108(11):955–962, 2012.

Capitolo 2

Scopo della tesi

La resistenza farmacologica all'aspirina è un fenomeno conosciuto e studiato da più di un decennio ed è ritenuta un fattore di rischio aggiuntivo nei pazienti in trattamento cronico con aspirina. L'esposizione cronica all'aspirina determina un aumento dell'espressione piastrinica di MRP-4¹.

MRP4/ABCC4 è un trasportatore unidirezionale di anioni organici e ha per questo un ruolo nella detossificazione della cellula da questi composti, essendo l'aspirina un anione organico, si ritiene che l'aumentata espressione del trasportatore MRP4 possa essere potenzialmente implicato nella resistenza all'aspirina.

Infatti è stato dimostrato che:

1. L'aspirina, quale acido debole, è un substrato di MRP-4, che è in grado quindi di estruderla dal citosol piastrinico prima che inibisca l'isoforma piastrinica della COX-1.
2. L'inibizione in vitro della MRP-4 si riflette in un aumento di efficacia dell'aspirina sull'inibizione della COX-1 piastrinica.
3. Piastrine, derivate da megacariociti che presentano una ridotta espressione di MRP-4, mostrano una maggiore concentrazione intrapiastrinica di aspirina ed un maggiore ef-

¹Cfr. Isabella Massimi, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, Carlo Gaudio, Marco Gabbianelli, Luigi Frati, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6):1343–1353, 2014.

fetto sulla COX-1 rispetto ai controlli.².

Recentemente è stato dimostrato che l'esposizione cronica all'aspirina determina un aumento dell'espressione piastrinica di MRP-4³.

Infatti, pazienti in terapia cronica con aspirina dovrebbero presentare una diminuita attivazione piastrinica. Tuttavia, indipendentemente dalla terapia antiaggregante i pazienti risultano comunque a rischio di ulteriori eventi trombotici. La risposta agli agenti antiaggreganti varia e alcuni pazienti presentano un grado di "resistenza all'aspirina". Tali pazienti risultano ugualmente esposti al rischio CV a causa del fenomeno dell'elevata reattività piastrinica all'aspirina (HARPR), per cui si verifica un'inibizione incompleta ed insufficiente dell'attivazione delle piastrine, che, in definitiva, si esplica in una diminuita efficacia della terapia con aspirina. L'HARPR è un fenomeno di origine multifattoriale e tra i fattori di rischio che lo inducono si è dimostrato avere un ruolo la sovraespressione di MRP4.⁴ Pazienti in terapia cronica con aspirina, con postumo evento SCA, sono tali in conseguenza di quello che può essere identificato come "resistenza alla aspirina", o meglio, definito come "fallimento terapeutico".

In sintesi, l'ipotesi è che l'aumentata espressione di MRP-4, secondaria alla terapia cronica con aspirina, sia uno dei meccanismi responsabili della resistenza all'aspirina.

L'obiettivo dello studio è quindi quello di verificare l'esistenza di associazione tra l'overespressione di MRP4 ed eventi di sindrome coronarica acuta (SCA) in pazienti in trattamento cronico con aspirina, poiché, ad oggi, non è dimostrato se tale sovraespressione possa essere

²Cfr. Teresa Mattiello, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Elisabetta Trifirò, Maria Pia Felli, Alessandro Barbarulo, Bruna Pucci, Paola Gazzaniga, Carlo Gaudio, Luigi Frati, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(7):752–761, 2011.

³Cfr. Isabella Massimi, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, Carlo Gaudio, Marco Gabbianelli, Luigi Frati, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6):1343–1353, 2014.

⁴Cfr. Laura Alemanno, Isabella Massimi, Vanessa Klaus, Maria Luisa Guarino, Teresa Maltese, Luigi Frati, Dominick J Angiolillo, and Fabio M Pulcinelli. Impact of multidrug resistance protein-4 inhibitors on modulating platelet function and high on-aspirin treatment platelet reactivity. *Thrombosis and haemostasis*, 118(03):490–501, 2018

un fattore di rischio cardiovascolare.

La ridotta azione dell'aspirina sulla COX-1 è un fattore di rischio che, se individuato, può essere trattato e quindi modificabile.

L'obiettivo dello studio consiste, inoltre, nell'identificazione di pazienti meno sensibili all'azione dell'aspirina a causa della sovraespressione di MRP4 così da poter essere indirizzati verso un trattamento farmacologico mirato.

Inoltre, vogliamo verificare se tale sovraespressione sia maggiore in pazienti con pregresso evento SCA rispetto a pazienti in trattamento cronico con aspirina in assenza di eventi CV.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Selezione dei pazienti

Sono stati considerati:

- pazienti con eventi di NSTEMI in terapia cronica con Aspirina (75-150 mg/die) da almeno due mesi (SCA);
- pazienti in terapia cronica con aspirina (75-150 mg/die) da almeno due mesi, in assenza di SCA, ma con una storia di malattia coronarica o che presentino uno o più fattori di rischio aterotrombotici (ASA)
- Pazienti con dispositivo di supporto meccanico al circolo, in doppia terapia antiaggregante aspirina (100 mg/die) + Clopidogrel (VAD)
- Pazienti con fattori di rischio e assunzione di farmaci simili a pazienti ASA, con la sola esclusione del trattamento con Aspirina (CTR)
- Volontari sani, senza diagnosi di SCA e non in trattamento cronico con aspirina (HV)

La conformità dei pazienti arruolati è stata accertata prima del prelievo e successivamente confermata dall'analisi dell'aggregazione.

Le piastrine utilizzate nello studio sono state ottenute rispettivamente da sangue venoso di pazienti appartenenti a ciascuno dei suddetti gruppi.

I soggetti sono stati scelti indipendentemente dal sesso e dall'età.

Per poter partecipare all'esperimento, tutti i soggetti reclutati hanno espresso consenso informato.

Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera "San Camillo Forlanini" di Roma.

3.1.1 Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dallo studio:

1. pazienti con traumi o interventi chirurgici nei tre mesi precedenti
2. pazienti affetti da malattie infiammatorie o infettive
3. pazienti affetti da patologie neoplastiche
4. pazienti con disordini immunologici o ematologici
5. pazienti che assumono farmaci che interferiscono con la funzionalità piastrinica o che abbiano assunto FANS in modo continuativo nei 30 gg precedenti l'arruolamento

3.2 Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e plasma povero di piastrine (PPP)

Il sangue venoso dei pazienti è stato prelevato evitando turbolenze o stasi in modo da non favorire l'attivazione piastrinica ed è stato raccolto in provette contenenti sodio citrato (9:1) ed EDTA.

Il campione è stato sottoposto ad emocromo, per effettuare un controllo sulla quantità delle piastrine presenti.

A questo punto il campione è stato sottoposto a 200 x g per 15 minuti usando una centrifuga da banco, così da ottenere la separazione in diverse fasi delle componenti ematiche. Il sovranatante ottenuto dopo la centrifugazione è costituito da PRP (Platelet Rich Plasma). Da questi campioni centrifugati è stata prelevata la fase plasmatica superiore contenente le piastrine e non la fase

inferiore contenente globuli rossi, non di nostro interesse.

La provetta contenente i globuli rossi e l'anello leucocitario viene sottoposta ad una successiva centrifugazione per 10 minuti a 2000 x g, in modo da ottenere un plasma povero di piastrine (PPP).

3.3 Aggregazione piastrinica con aggregometro di Born

L'aggregazione piastrinica è l'analisi impiegata ai fini della valutazione della funzionalità piastrinica, cioè della capacità intrinseca di attivazione in seguito allo stimolo da parte degli appositi agonisti. Questo test è considerato il gold standard per lo studio di eventuali deficit di funzionalità piastrinica. Il test di aggregazione piastrinica è stato effettuato secondo il metodo di Born, utilizzando un aggregometro AggRam della Helena con 4 canali. Tali canali sono mantenuti ad una temperatura di 37°C e sono inoltre dotati di un agitatore magnetico, che permette di mantenere le piastrine a condizioni di temperatura e di turbolenza fisiologiche. La valutazione dell'aggregazione effettuata dall'aggregometro è basata su una valutazione di tipo turbidometrica: in seguito all'aggiunta di agonista alle piastrine in agitazione a 37°C, si ha la formazione di aggregati piastrinici che rendono la soluzione più limpida. L'aggregometro misura le variazioni di densità ottica in seguito all'aggiunta dell'agonista, restituendo una curva che ne descrive la variazione. In particolare, lungo l'asse delle ordinate viene espresso il tempo che trascorre dall'aggiunta dell'agonista e lungo le ascisse il grado di aggregazione. L'agonista utilizzato è acido arachidonico 0,75 mM.

L'aggregazione indotta da acido arachidonico è dipendente dalla produzione di TXA₂ e perciò più sensibile a variazioni indotte dal trattamento con aspirina. Infatti, anche se l'aggregazione dopo stimolo con acido arachidonico di fatto rappresenta il test più specifico per valutare l'attività dell'enzima COX-1, è ben chiaro che nei pazienti aderenti alla terapia con aspirina esiste una variabilità farmacodinamica molto limitata, poiché l'attività dell'enzima COX-1 è pienamente soppressa. In questo studio l'aggregazione piastrinica indotta dall'acido arachidonico è stata utilizzata come marcatore per garantire l'adesione di tutti i pazienti al trattamento con aspirina, dove per aderenza si è intesa un'aggregazione piastrinica massima < 20%.

Tutti i valori ottenuti di aggregazione piastrinica hanno confermato la compliance dei pazienti.

3.3.1 Preparazione di piastrine per estrazione e quantificazione proteica

Il PRP (Plasma Rich of Platelet) ottenuto è stato sottoposto nuovamente a conteggio con emocromo per valutare il numero di piastrine. Dopo aver effettuato la conta piastrinica, dal PRP è stato prelevato il volume necessario contenente 400 milioni di piastrine e inserito in provette Eppendorf (1.5 mL) a cui sono stati aggiunti 100 µl di ACD (Acid Citrate Dextrose; sodio citrato bibasico 0,1 M, acido citrico 7mM e glucosio anidro 140 mM), prima di essere sottoposti a centrifuga 9200 g per 3 minuti. Al termine di questi, viene rimosso il supernatante ed al pellet rimanente sono aggiunti TYRODE (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ x H₂O 0,47 mM, MgCl₂ x 6 H₂O 2 mM e glucosio 140 mM) 1 ml ed ACD 100 µl. Il campione è stato sottoposto nuovamente a centrifuga 9200 g per 3 minuti così da ottenere pellet definitivamente lavato. Il pellet ottenuto viene lisato mediante buffer di lisi (RIPA buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 160 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% deoxycholic acid, 1% Triton, 0.1% SDS) (Sigma-Aldrich (NaCl 159 mM, EGTA 1 Mm, Tris 9,9 Mm, DOC-deoxycholic acid-1% w/v, TRITON x 100% v/v, SDS 0,1% w/v, a Ph 7,6) a cui si è aggiunto inibitore (1:100) delle proteasi. Il lisato è lasciato ad incubare 30 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugato 13.000 rpm per 30 minuti a 4°C. Al termine, si recupera il supernatante contenente le proteine.

Segue la quantificazione proteica dei campioni grazie al saggio dell'acido bicinconinico (BCA) o anche detto "saggio Smith".

Per ogni determinazione è allestita una curva di calibrazione, in doppio, utilizzando come standard 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg di albumina di siero bovino. La lettura della fluorescenza del supernatante è stata fatta con l'uso del fluorimetro Victor-3 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, United States). La quantità di proteina del campione è calcolata, con l'ausilio del foglio di calcolo Excel, per interpolazione sulla retta di regressione lineare ottenuta dalla lettura degli standard.

3.4 Elettroforesi delle proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

3.4.1 Preparazione dei campioni

Per ogni campione da sottoporre ad elettroforesi vengono caricati 40 µg di proteina e per la loro denaturazione un'opportuna quantità di tampone, pari a 5 µg, per caricare (sample buffer) è aggiunta al campione. È stato utilizzato l'LDS sample buffer NuPAGE® concentrato 4X (concentrazione finale: 0,175 M Tris-HCL pH 6,8, 2% SDS, 35% glicerolo, 0,72 M b-mercaptoetanol, 0,05% blu di bromofenolo). Dopo l'aggiunta del sample buffer, i campioni sono trattati per 30 minuti ad una temperatura di 37°C.

L'elettroforesi delle proteine, in condizioni denaturanti, è eseguita su gel di poliacrilammide al 10%, spesso 0.1 cm (nUView Tris-Glycine precast gels NB12-420; 0.1 cmx 10 cmx 8.5). I pozzetti vengono riempiti con i campioni preparati come detto in precedenza. In ciascun esperimento come marker di peso molecolare è usata una miscela di proteine note (NeoBiotech \ SeeBlue). La corsa elettroforetica è effettuata a voltaggio costante di 100V per i primi 30 minuti, trascorsi i quali viene aumentato il voltaggio al valore di 150V per la durata di 2 ore immergendo le membrane in un tampone di corsa in grado di garantire la continuità elettrica, costituito da Tris-base 25mM, Gly 192mM, SDS 0,1% w/v, pH 8,3, rispettivamente:

- 1080 ml H₂O
- 12 ml SDS
- 120 ml Tris Gly

3.5 Western blot

3.5.1 Trasferimento e incubazione con l'anticorpo primario e secondario

Dopo la corsa elettroforetica il gel di poliacrilammide viene tolto dalla camera di corsa per essere sottoposto al trasferimento su membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) o nitrocellulosa. Il trasferimento avviene con l'ausilio del sistema di trasferimento di proteine Mini Trans-Blot (BIO-RAD), che effettua il trasferimento da gel a membrana a 100 V e 0.2 Ampere per la durata di due ore. Alla fine del trasferimento i fogli di nitrocellulosa sono colorati con una soluzione di Rosso Ponceau allo 0,2% in acido tricloroacetico al 3%, lasciando in agitazione 5 minuti a temperatura ambiente, al fine di verificare che il trasferimento sia avvenuto correttamente. Una volta accertato il corretto trasferimento, si taglia la membrana sulla base delle bande proteiche d'interesse, così da permettere l'incubazione successiva con gli anticorpi specifici.

Infine, si decolorano completamente le membrane con un lavaggio in TBST contenente Tween-20 allo 0,01% v/v (PBS-T 0,01%), di 5 minuti a temperatura ambiente.

Il bloccaggio dei siti aspecifici di legame delle proteine alla PVDF è ottenuto incubando la membrana per 1 ora a temperatura ambiente in latte scremato in polvere, diluito al 5% w/v in TBS-T 0,01%. Una delle due membrane quindi, è incubata per tutta la notte con un anticorpo primario policlonale anti- β actina (Cohesion, CPA1009), diluito 1:1000 v/v, in TBS-T 0,01% contenente latte scremato al 2,5% w/v. La seconda membrana viene, invece, incubata con un anticorpo primario policlonale anti-MRP4 anche esso diluito 1:1000 (GeneTex, GTX30016). Il giorno seguente le membrane sono lavate 3 volte per 10 minuti ciascuna a temperatura ambiente con PBS-T 0,01%. Al termine dei lavaggi, le membrane vengono incubate per 1 ora con un anticorpo secondario diluito 1:5000 v/v in PBS-T 0,01% contenente latte scremato al 2,5% w/v. Come anticorpo secondario è stato utilizzato un anticorpo anti-immunoglobuline di topo per la β actina e uno anti-immunoglobuline di coniglio per MRP4, entrambi purificati per affinità e coniugati con l'enzima perossidasi.

Le membrane, infine, sono sottoposte a 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno a temperatura ambiente con PBS-T 0,1%.

Tutti i lavaggi e le incubazioni sono effettuati in leggera agitazione. L'identificazione della proteina è stata effettuata mediante anticorpi policlonali primari diretti contro gli MRP4, e anticorpi secondari coniugati con la perossidasi e successivamente trattata con ECL (soluzione contenente un substrato chemiluminescente) per la produzione di luce che può essere rilevata ad una lastra fotografica.

3.6 Analisi densitometrica dell'espressione proteica

Dopo aver ottenuto le lastre grazie ad una sviluppatrice ed averle acquisite è stata svolta l'analisi densitometrica. Quest'ultima è stata eseguita sulle bande proteiche d'interesse con il programma d'analisi ImageG del National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.7 ABCC4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (ELISA)

Il kit ELISA è un kit commerciale utilizzato per l'immunodosaggio in vitro del trasportatore ABCC4 umano (Cloud Clone, SED624Hu). In ciascun pozzetto della micropiastra, pre-rivestita con un anticorpo specifico per ABCC4 coniugato con biotina, sono stati caricati i campioni (100µl). Successivamente, ad ogni pozzetto è stata aggiunta l'avidina coniugata alla perossidasi di rafano (HRP) e lasciata ad incubare. Al termine, è stata aggiunta la soluzione substrato TMB ed esclusivamente i pozzetti contenenti ABCC4 l'anticorpo coniugato con biotina e l'enzima coniugato all'avidina hanno mostrato un viraggio di colore. La reazione viene interrotta tramite l'aggiunta di una soluzione di acido solforico e la variazione colorimetrica è stata valutata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 450 nm con l'uso del fluorimetro Victor-3 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, United States). La concentrazione di ABCC4 del campione è stata poi determinata confrontando l'O.D. dei campioni con quello della curva standard ed è stato poi ricavato il valore di concentrazione proteica con l'ausilio del foglio di calcolo Excel, per interpolazione sulla retta di regressione lineare ottenuta dalla lettura degli standard.

3.8 Metodi statistici

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei risultati ottenuti dalle analisi di Western blot, è stato dapprima applicato il test di Shapiro-Wilk per la verifica della normalità, da cui è risultata una lieve distribuzione non normale dei dati. Essendo lieve lo scostamento dalla distribuzione normale per il confronto fra i tre gruppi è stato utilizzato l'analisi della varianza ad una via associata al post-test Tukey-HD per il confronto multiplo.

Le variabili sono state rappresentate graficamente attraverso i grafici di box plot, che mostrano la distribuzione dei dati intorno alla mediana di ciascun campione.

Per quanto concerne, invece, l'analisi dei dati ottenuti dalla quantizzazione di MRP4 plasmatico, è stata verificata la normalità sempre eseguendo il test di Shapiro-Wilk che ha dato esito positivo e ci ha permesso di valutare i dati con il test-t di Student per campioni non appaiati. Il valore soglia di p considerato per la significatività statistica dei risultati è uguale o superiore 0,05 ($p\text{-value} > 0,05$).

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software, Reading, Pennsylvania, USA).

Capitolo 4

Risultati

4.1 Espressione di MRP4 in piastrine di pazienti in trattamento cronico con aspirina

Al fine di studiare l'espressione piastrinica di MRP4 in pazienti in trattamento cronico con aspirina, ne è stata analizzata l'espressione nei seguenti gruppi: SCA (N=35), ASA (N=15), CTR (N=22). Le caratteristiche demografiche e cliniche di ciascun gruppo sono riportate nella tabella 1, in cui si può notare che i soggetti arruolati presentano caratteristiche omogenee sia per quanto riguarda l'età, il genere, i trattamenti farmacologici e anche per i fattori di rischio cardiovascolare.

Caratteristiche	Caratteristiche di base dei pazienti		
	SCA (N=35)	ASA (N=15)	CTR (N=22)
Età (mean ± SD, anni)	72 ± 9	63 ± 13	59 ± 11
Uomini, n (%)	32 (11,2)	6 (0,9)	14 (3,08)
Donne, n (%)	3 (1,05)	9 (1,35)	8 (1,76)
Condizioni cliniche e fattori di rischio (RF)			
Iperensione, n (%)	33 (5,28)	3 (0,48)	0
Ipercolesterolemia, n (%)	0	4 (0,64)	3 (0,66)
Fumo, n (%)	2 (0,7)	2 (0,32)	4 (0,88)
Precedente MI (NSTEMI), n (%)	24 (8,4)	0	0
Precedente infarto, n (%)	30 (10,5)	3 (0,48)	0
Precedente TIA, n (%)	9 (3,15)	2 (0,32)	1 (0,22)
Farmaci			
Agenti beta-bloccanti, n (%)	26 (9,1)	16 (2,56)	7 (1,54)
Antagonisti del calcio, n (%)	7 (4,5)	2 (0,32)	0
ACE- inibitori, n (%)	32 (11,2)	6 (0,96)	5 (1,1)
ARBs/angiotensina 2, n (%)	0	2 (0,32)	2 (0,44)
Nitrati, n (%)	1 (0,35)	0	0
Statine, n (%)	21 (7,35)	5 (0,8)	4 (0,88)

Figura 4.1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei gruppi di pazienti infartuati (SCA), trattati con aspirina (ASA) e controlli (CTR).

4.2 Analisi dell'espressione di MRP4 in pazienti in trattamento cronico con aspirina

I livelli di espressione della proteina MRP4, mostrati in figura, rappresentativa di un'analisi fatta tramite Western Blot, indicano un aumento dell'espressione di MRP4 in piastrine ottenute da pazienti SCA rispetto a piastrine ottenute da pazienti ASA (Figura 4.2).

I livelli di espressione, mostrati in figura 4.2, sono stati ottenuti rapportando il valore densitometrico di espressione della proteina MRP4 al valore densitometrico di espressione della proteina β -actina, usata come normalizzatore. In ogni Western Blot è stata analizzata l'espressione di MRP4.

L'analisi densitometrica sul numero totale dei pazienti conferma, infatti, un aumento della proteina MRP4 in piastrine ottenute da pazienti SCA in confronto all'espressione che si ha in piastrine derivate da pazienti ASA.

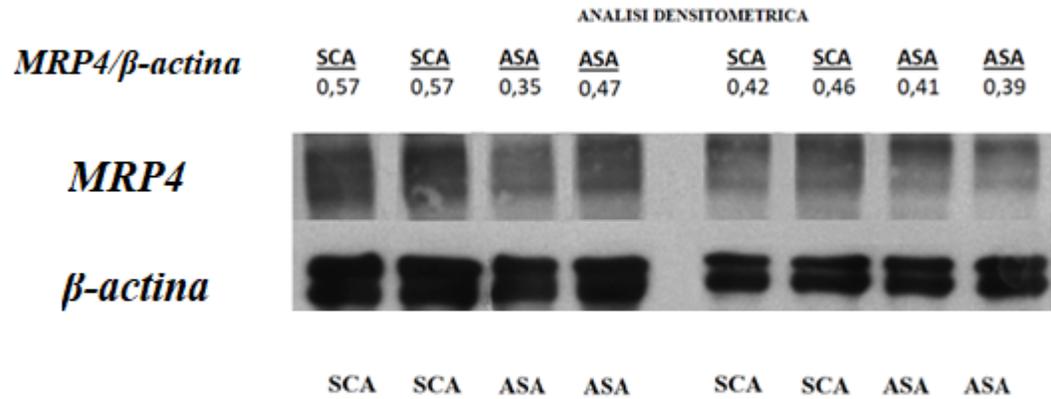


Figura 4.2: **Analisi dell'espressione della proteina MRP4 in pazienti in trattamento cronico con aspirina mediante Western Blot.**

Differenze di espressione della proteina MRP4 tra pazienti SCA e pazienti ASA. L'espressione della β -actina è stata utilizzata come normalizzatore.

L'espressione della β -actina è stata utilizzata come normalizzatore.

L'esatta identificazione di MRP4 è stata effettuata utilizzando un estratto proteico di cellule Hek-293 transfettate (MRP4 Hek-293 cells) che sovraesprimono MRP4 vs estratto proteico di cellule di controllo (PCDNA3.1 Hek-293 cells).

L'analisi dell'espressione proteica condotta con la tecnica del Western Blot, illustrata in dettaglio nel capitolo Materiali e Metodi, ha prodotto la seguente statistica mostrata in figura 4.3.

Per normalizzare i livelli di grigio dei differenti gel sono stati corsi 3 estratti proteici, derivati da volontari sani (HV), per ciascun gel.

I risultati sono ottenuti dal rapporto dell'aumento dei livelli di grigio (MRP4/actina), per ciascun campione, rispetto alla media complessiva del rapporto MRP4/actina degli HV.

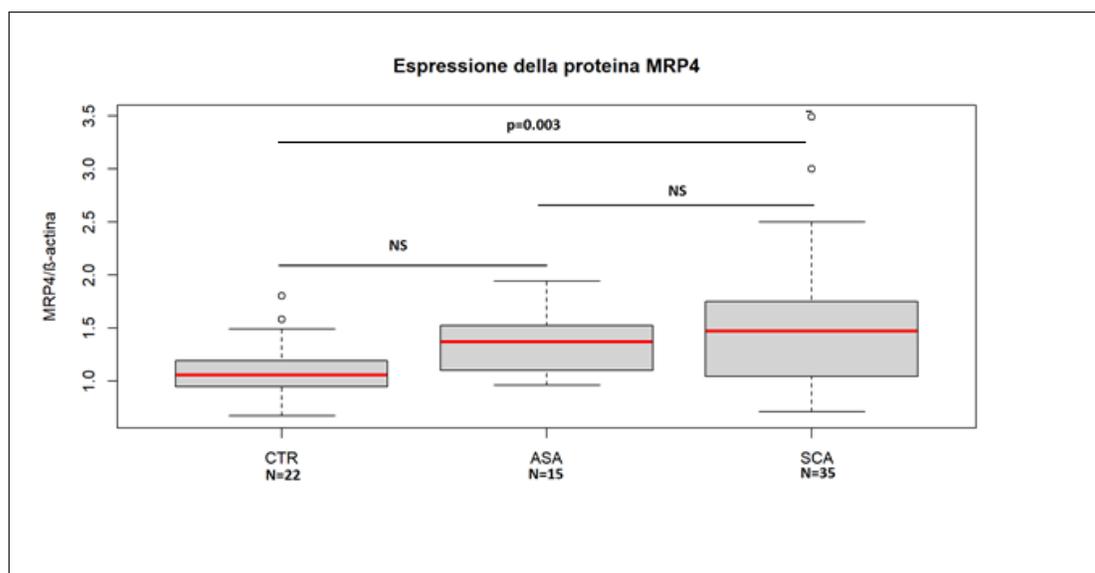


Figura 4.3: **Espressione piastrinica della proteina MRP4.**

Analisi densitometrica di MRP4 tramite Western Blot in CTR (N=22), ASA (N=15), SCA (N=35).

Le differenze statistiche sono riportate come Media±SD

L'analisi densitometrica ha mostrato un aumento statisticamente significativo della proteina MRP4 in piastrine ottenute dalla popolazione di pazienti SCA (N=35) rispetto a quelle ottenute dalla popolazione di controllo (N=22) ($1,52 \pm 0,619$ vs $1,09 \pm 0,06$; p-value=0,003). Le variazioni densitometriche tra la popolazione ASA e la popolazione CTR ($1,39 \pm 0,06$ vs $1,09 \pm 0,06$; p-value=0,18) e quelle tra le popolazioni SCA e ASA non hanno prodotto un risultato statisticamente significativo ($1,52 \pm 0,619$ vs $1,34 \pm 0,06$; p-value=0,3885). L'aumento del contenuto di MRP4 piastrinico in pazienti ASA rispetto a pazienti di controllo è del tutto simile a quanto ottenuto in un precedente lavoro del nostro gruppo.¹ Analogamente anche l'aumento di

¹Cfr. Isabella Massimi, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Si-

espressione di MRP4 in pazienti SCA, evidenzia un trend di aumento che non è statisticamente significativo per il ridotto numero dei pazienti selezionati.

Il fatto che i risultati non risultino statisticamente significativi potrebbe dipendere dal ridotto numero di pazienti arruolati in questo lavoro, a causa delle circostanze pandemiche.

4.3 Kit ELISA per la quantizzazione di MRP4

E' stato dimostrato che l'espressione di iper-reattività piastrinica correla con la sovraespressione di MRP4 e questo aspetto è stato valutato attraverso uno studio dell'mRNA-MRP4 piastrinico, condotto presso il nostro laboratorio.²

Abbiamo voluto studiare se fosse possibile valutare le differenze nell'espressione di MRP4 mediante una metodologia di facile utilizzo in un laboratorio di routine (ELISA) e, sorprendentemente, abbiamo riscontrato quantità dosabili di MRP4 nel plasma. La misurazione del livello di espressione di MRP4 plasmatico è stata pertanto approfondita per valutare se fosse correlabile all'espressione di MRP4 nelle piastrine. Per questo motivo abbiamo anche condotto studi di associazione tra MRP4 plasmatico e mRNA-MRP4 piastrinico, considerato gold standard, in CTR e ASA. Per valutare ulteriormente l'ipotesi secondo cui MRP4 dosato nel plasma sia espressione di MRP4 piastrinico, abbiamo condotto il dosaggio immunoenzimatico della proteina MRP4 prendendo in considerazione un'altra categoria di soggetti, pazienti con dispositivo di supporto meccanico al circolo, VAD (dall'acronimo inglese Ventricular Assist Device) in doppia terapia antiaggregante aspirina (100 mg/die)+Clopidogrel. Il dispositivo VAD è, difatti, noto per essere un dispositivo di supporto meccanico e funziona come una pompa meccanica ausiliaria capace di generare un flusso ematico continuo. Il sangue viene prelevato dal ventricolo malato, sia esso il sinistro o il destro, e pompato grazie ad una turbina nell'aorta o nell'arteria

Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, and Fabio M Pulcinelli. Enhanced platelet mrp4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment. *Thrombosis and haemostasis*, 116(12):1100–1110, 2016.

²Cfr. Isabella Massimi, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Simone Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, and Fabio M Pulcinelli. Enhanced platelet mrp4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment. *Thrombosis and haemostasis*, 116(12):1100–1110, 2016.

ria polmonare. Il VAD è generalmente impiantato in pazienti con indebolimento cardiaco o con insufficienza cardiaca. I risultati ottenuti da precedenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato un aumento del quantitativo dell'mRNA-MRP4 piastrinico a confronto di quanto trovato in piastrine ottenute da pazienti di controllo e pazienti in trattamento cronico con aspirina da più di due mesi, come mostrato in Fig. 4.4 (dato non pubblicato).

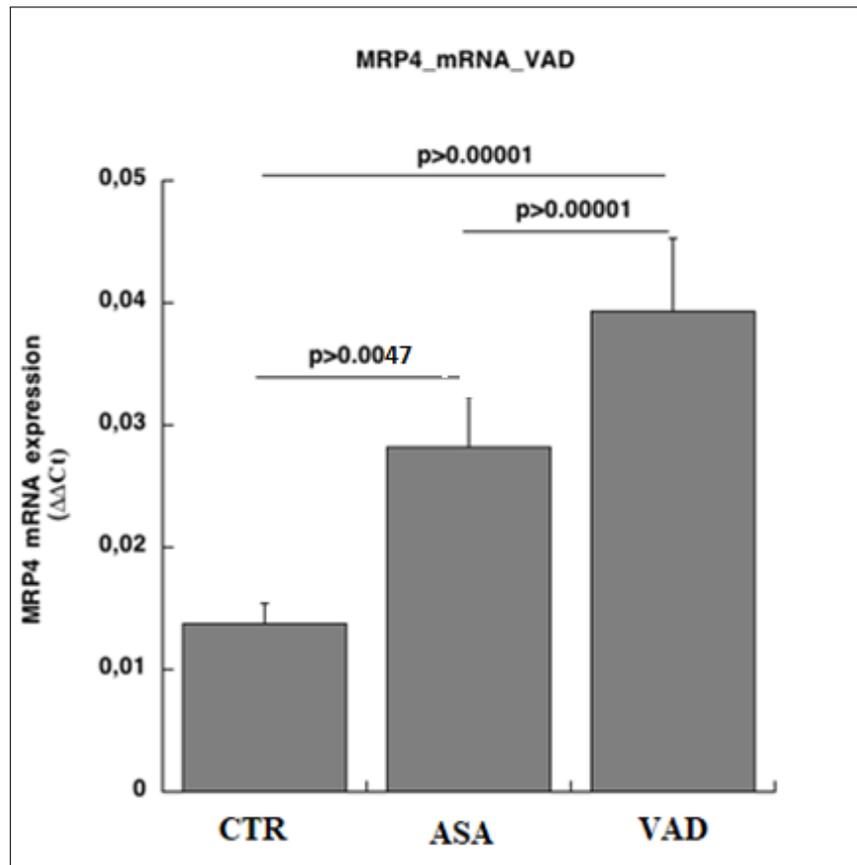


Figura 4.4: **MRP4 piastrinico.**

Istogramma di mRNA-MRP4 in pazienti di controllo (CTR, N=46), in pazienti in trattamento con aspirina (ASA, N=166) e in pazienti con dispositivo VAD (VAD, N=15).

A seguito di quanto sopra riportato abbiamo voluto analizzare la concentrazione plasmatica (ng/mL) di MRP4 nei soggetti di controllo (N=20), nei pazienti in trattamento cronico con aspirina (N=30) e nei pazienti con VAD (N=15).

I risultati ottenuti, mediante kit ELISA, parallelamente a quanto visto con l'analisi dell'mRNA, hanno mostrato che i pazienti VAD, hanno un significativo aumento della proteina plasmatica MRP4 rispetto al quantitativo riscontrato nei pazienti in trattamento cronico con aspirina (ASA) e nei soggetti di controllo (CTR) ($2,461 \pm 6,036$ vs $0,522 \pm 0,196$; $p=0,004$) ($2,461 \pm 6,036 \pm 0,464 \pm 0,487$; $p=0,002$), (CTR<ASA<VAD) (Fig.4.5).

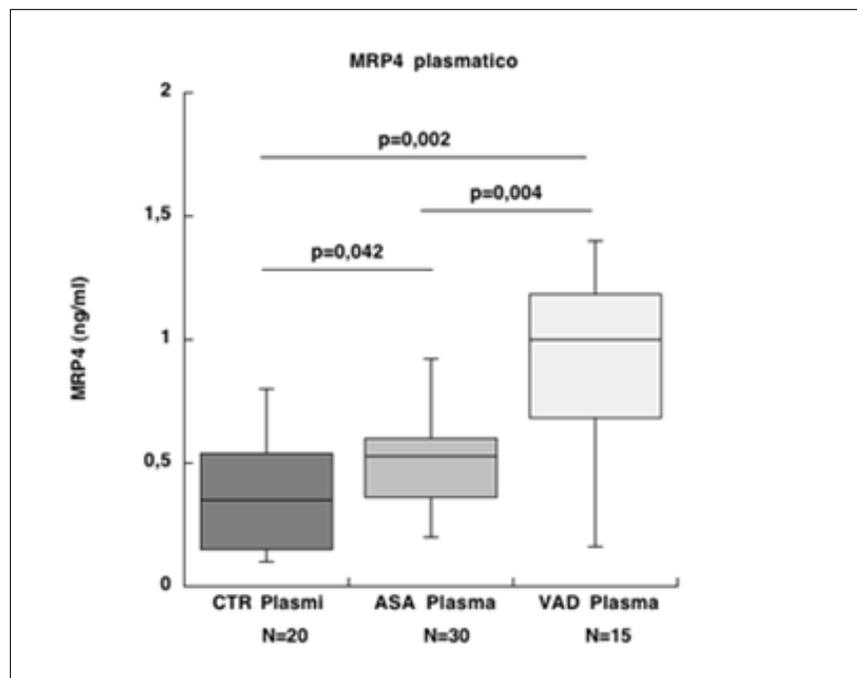


Figura 4.5: **MRP4 plasmatico**

Box plot di MRP4 plasmatico in pazienti di controllo (CTR, N=20), in pazienti in trattamento con aspirina (ASA, N=30) e in pazienti con dispositivo VAD (VAD, N=15).

Le differenze statistiche sono riportate come Media \pm SD

Assume quindi un importante ruolo la presenza della sovraespressione dell'mRNA di MRP4 e del dosaggio plasmatico nei pazienti con VAD a confronto dei pazienti trattati con aspirina per più di due mesi. Infatti, sia mRNA-MRP4 piastrinico che il dosaggio plasmatico di MRP4 sono risultati nettamente superiori nei pazienti VAD rispetto ai pazienti in trattamento cronico con Aspirina. E' stato quindi dosato MRP4 nel plasma e ciò ha permesso di valutare se ci fossero differenze tra il dosaggio condotto su plasma ottenuto da pazienti aspirinati e pazienti SCA.

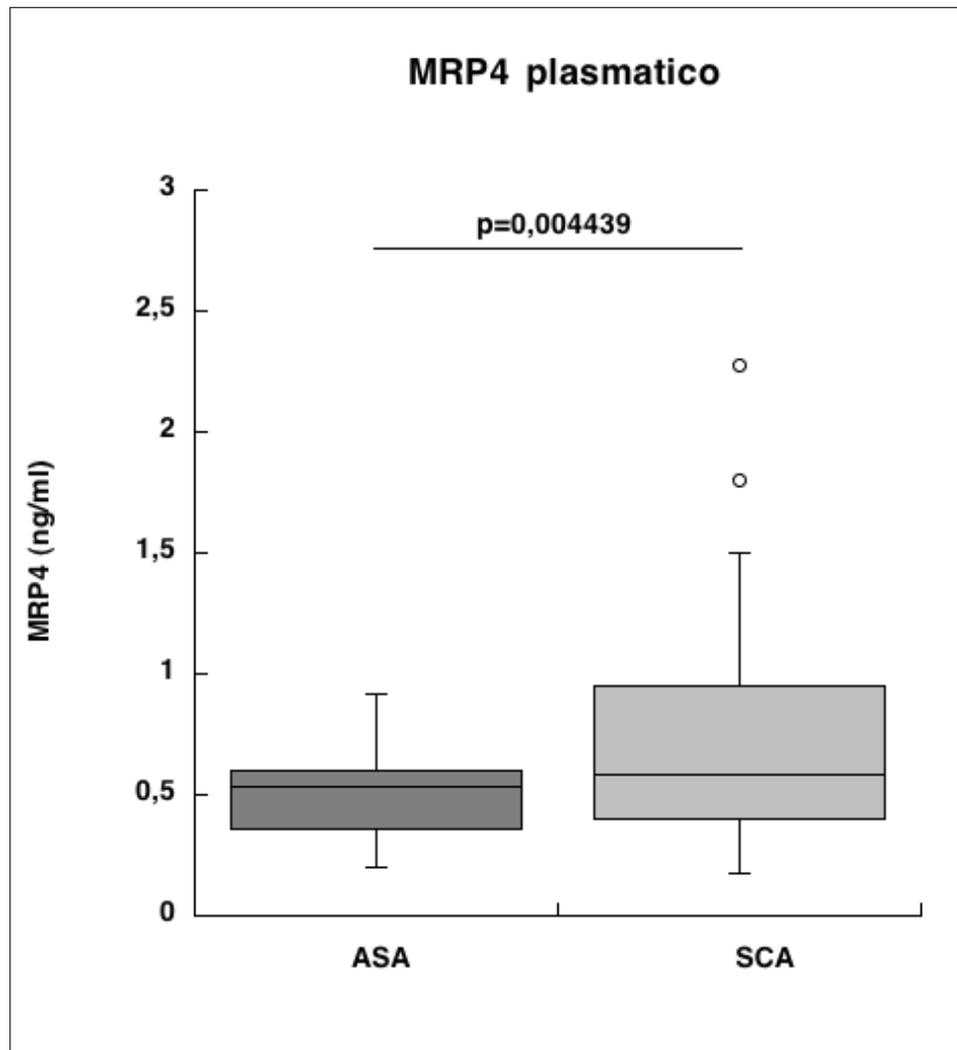


Figura 4.6: **MRP4 piastrinico.**

Box plot di MRP4 plasmatico nel gruppo di pazienti ASA (N=60) e nel gruppo di pazienti SCA (N=30).

Le differenze statistiche sono riportate come Media±SD

I risultati ottenuti hanno infatti mostrato un quantitativo maggiore, statisticamente significativo, di MRP4 plasmatico nei pazienti SCA rispetto a quanto trovato nei pazienti ASA ($0,718 \pm 0,434$ vs $0,522 \pm 0,196$; $p=0.00439$) (Fig. 4.6).

Capitolo 5

Discussione

In precedenza è stato dimostrato che l'aspirina, in pazienti in terapia cronica, è in grado di determinare sovraespressione di MRP4 nelle piastrine.

Grazie ai risultati ottenuti con il presente progetto di tesi possiamo affermare che i pazienti in trattamento cronico con aspirina che hanno avuto un evento SCA tale sovraespressione è aumentata. I risultati ottenuti dalle analisi condotte con esperimenti di Western Blot e di dosaggio ELISA di MRP4 piastrinico nelle popolazioni arruolate hanno dimostrato che nei pazienti in trattamento cronico con aspirina che hanno avuto un evento di sindrome coronarica acuta (SCA) l'espressione della proteina MRP4 è aumentata sia nelle piastrine che nel plasma. Quando MRP4 risulta essere sovraespresso nelle piastrine, l'azione dell'aspirina risulta meno efficace nell'inibire l'enzima COX-1. L'aspirina è quindi un farmaco in grado di modulare l'espressione genica con conseguente aumento dell'espressione della proteina canale MRP4.

La sovraespressione, in linea con le funzioni fisiologiche di estrusione di xenobiotici, comporta aumentata escrezione di aspirina dalle piastrine con conseguente riduzione dell'efficacia terapeutica. L'estrusione dell'aspirina dalle cellule ad opera del trasportatore sovraespresso in seguito a terapia cronica potrebbe, quindi, essere una delle cause degli eventi SCA in tali pazienti.

Evidenze cliniche e di laboratorio mettono in luce la variabilità dell'efficacia terapeutica dell'aspirina nei diversi soggetti. Da queste è infatti emerso il concetto di residua attività piastrinica e cioè di resistenza all'aspirina per definire il fallimento terapeutico in pazienti in trattamento cronico. La dimostrazione del legame tra la risposta piastrinica subottimale all'aspirina e

l'aumento del rischio di eventi cardiovascolari ha suggerito il concetto di monitoraggio della terapia antiplastrinica. Possiamo affermare che la sovraespressione di MRP4 è una causa di questo fenomeno e che l'identificazione di tale meccanismo può essere utile per individuare i pazienti a maggior rischio. Possiamo attribuire la maggiore quantità di MRP4 plasmatico nei pazienti con SCA ad aumentata espressione di MRP4 piastrinico, in quanto abbiamo dimostrato che mRNA-MRP4 è maggiore nei VAD rispetto a pazienti ASA, i quali a loro volta presentano un quantitativo maggiore rispetto a quanto trovato nei soggetti di controllo (VAD > ASA > CTR), parallelamente alla quantizzazione di MRP4-mRNA piastrinico.

Le metodiche per l'analisi dell'espressione di MRP4 nelle piastrine si avvalgono della valutazione del quantitativo dell'mRNA piastrinico o del dosaggio dell'espressione proteica mediante la tecnica del Western Blot. Entrambe le metodologie presentano, tuttavia, grandi difficoltà per quanto concerne le fasi iniziali di preparazione del materiale biologico ed elevati costi per la loro realizzazione. Un approccio alternativo è quello del dosaggio con la tecnica ELISA.

Sorprendentemente abbiamo trovato quantità dosabili di questo trasportatore a livello plasmatico. Le variazioni della quantità di MRP4 dosato nel plasma con il kit ELISA correlano con quelle riscontrate nelle piastrine con l'analisi dell'mRNA in quanto abbiamo evidenziato un'associazione quantitativa tra il dosaggio di MRP4 nel plasma e l'entità ottenuta con mRNA-MRP4 nella popolazione di controllo, nei pazienti aspirinati e nei pazienti VAD. Nei pazienti con SCA, l'MRP4 plasmatico risulta essere superiore ai pazienti aspirinati in assenza di SCA. Sulla base di quanto riscontrato, si potrebbero identificare quei pazienti caratterizzati da un'aumentata espressione di MRP4, con un fenotipo iper-reattivo e quindi con una tendenza ad un maggiore rischio trombotico con un metodo alternativo come il dosaggio immunologico con Kit Elisa, che risulta essere una tecnica più adatta ad una routine quotidiana di laboratorio.

Capitolo 6

Conclusioni

In conclusione in questo lavoro dimostriamo che è possibile identificare i pazienti meno sensibili all'azione dell'aspirina dovuta a sovraespressione di MRP4. La correlazione tra la sovraespressione di MRP4 nelle piastrine e il fenotipo piastrinico iper-reattivo è stato dimostrato anche in soggetti portatori di HIV.¹ In tale lavoro gli autori hanno supposto che questa sia la causa di aumentato rischio di SCA in tale categoria di soggetti.²

In seguito ad analisi quantitativa che evidenzia sovraespressione di MRP4 si potrebbe procedere variando la terapia farmacologica, somministrando un inibitore di MRP4 associato all'aspirina per ridurre il rischio cardiovascolare, così da costituire un trattamento personalizzato rispetto alla pratica comune. La ridotta azione dell'aspirina sull'isoforma piastrinica della COX-1 potrebbe essere un fattore di rischio CV aggiuntivo modificabile.

L'obiettivo consisterebbe perciò nell'identificazione dei pazienti meno sensibili all'azione dell'aspirina, così da modificarne il trattamento farmacologico.

¹Cfr. Slim Azouzi, Mahmoud Mikdar, Patricia Hermand, Emilie-Fleur Gautier, Virginie Salnot, Alexandra Willemetz, Gael Nicolas, Cedric Vrignaud, Alexandre Raneri, Patrick Mayeux, et al. Lack of the multidrug transporter mrp4/abcc4 defines the pel-negative blood group and impairs platelet aggregation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 135(6):441–448, 2020.

²Cfr. Emanuela Marcantoni, Nicole Allen, Matthew R Cambria, Rebecca Dann, Michael Cammer, Tenzin Lhakhang, Meagan P O'Brien, Benjamin Kim, Tilla Worgall, Adriana Heguy, et al. Platelet transcriptome profiling in hiv and atp-binding cassette subfamily c member 4 (abcc4) as a mediator of platelet activity. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(1):9–22, 2018.

La medicina di precisione è un concetto sempre più emergente che ci permette di formulare e adattare le terapie farmacologiche in linea con le caratteristiche individuali di ogni paziente. La medicina di precisione è destinata a diventare la prossima grande rivoluzione nella pratica medica, nonché nel mantenimento della salute cardiovascolare e nella prevenzione e cura delle malattie cardiovascolari.

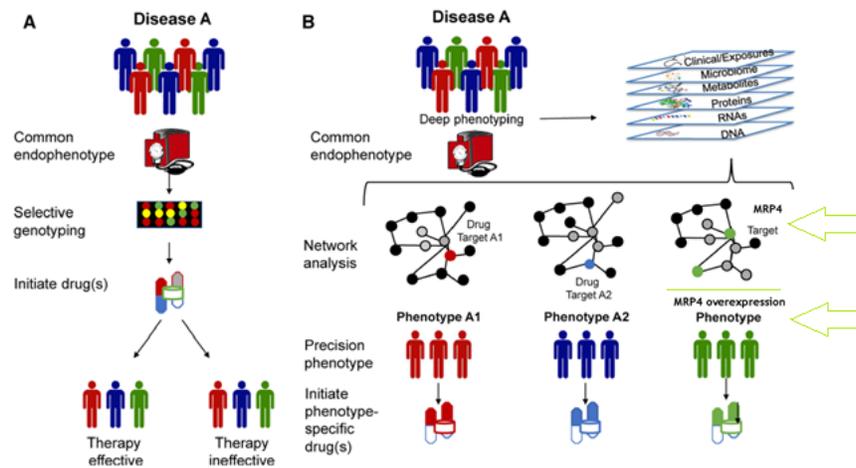


Figura 6.1: L'approccio della medicina di precisione alla fenotipizzazione (Leopold and Loscalzo 2018)³.

Immagine riadattata

La medicina di precisione si differenzia rispetto alla pratica standard in quanto attinge da grandi set di dati e nuovi metodi analitici, come la biologia dei sistemi, per creare un fenotipo specifico della persona che può quindi essere utilizzato per identificare un intervento ottimale con il minimo rischio. Molti sarebbero i potenziali benefici di questo approccio per pazienti, clinici e ricercatori. Di seguito vengono elencati alcuni esempi:

- specificità fenotipica individuale
- identificazione di individui con un fenotipo molecolare simile
- selezione dei migliori farmaci o terapie con la massima efficacia e reazioni avverse assenti o limitate
- selezione efficiente e arricchimento dei partecipanti alla sperimentazione clinica, potenziale per migliorarne l'aderenza e ridurre i costi

Il dosaggio di MRP4 plasmatico potrà essere un utile strumento per identificare i pazienti meno sensibili al trattamento con aspirina.

Pertanto possiamo concludere che la sovraespressione di MRP4 è indice di maggiore rischio cardiovascolare in pazienti in trattamento con aspirina. Questi pazienti si potrebbero quindi identificare mediante il dosaggio plasmatico di MRP4 ed essere rivolti ad un trattamento che comprenda la somministrazione di aspirina associata a quella di un farmaco inibitore della funzionalità di MRP4 (Cilostazolo)⁴.

⁴Cfr. Maria Luisa Guarino, Isabella Massimi, Laura Alemanno, Laura Conti, Dominick J An- giolillo, and Fabio M Pulcinelli. Mrp4 over-expression has a role on both reducing ni- tric oxide-dependent antiplatelet effect and enhancing adp induced platelet activation. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 51(3):625-632, 2021

6.1 Lavori futuri

Saranno necessari studi con una casistica maggiore per valutare il reale valore di rischio di questo parametro.

Bibliografia

- [1] Hesham K Abdelaziz, Marwan Saad, Naga Venkata K Pothineni, Michael Megaly, Rahul Potluri, Mohammed Saleh, David Lai Chin Kon, David H Roberts, Deepak L Bhatt, Herbert D Aronow, et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(23):2915–2929, 2019.
- [2] Laura Alemanno, Isabella Massimi, Vanessa Klaus, Maria Luisa Guarino, Teresa Maltese, Luigi Frati, Dominick J Angiolillo, and Fabio M Pulcinelli. Impact of multidrug resistance protein-4 inhibitors on modulating platelet function and high on-aspirin treatment platelet reactivity. *Thrombosis and haemostasis*, 118(03):490–501, 2018.
- [3] Dominick J Angiolillo, Masafumi Ueno, and Shinya Goto. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation Journal*, pages 1003020631–1003020631, 2010.
- [4] Slim Azouzi, Mahmoud Mikdar, Patricia Hermand, Emilie-Fleur Gautier, Virginie Sallnot, Alexandra Willemetz, Gaël Nicolas, Cédric Vrignaud, Alexandre Raneri, Patrick Mayeux, et al. Lack of the multidrug transporter mrp4/abcc4 defines the pel-negative blood group and impairs platelet aggregation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 135(6):441–448, 2020.
- [5] Cristina Barale, Franco Cavalot, Chiara Frascaroli, Katia Bonomo, Alessandro Morotti, Angelo Guerrasio, and Isabella Russo. Association between high on-aspirin platelet reactivity and reduced superoxide dismutase activity in patients affected by type 2 diabetes mellitus or primary hypercholesterolemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14):4983, 2020.

- [6] D Bluteau, L Lordier, A Di Stefano, Y Chang, H Raslova, N Debili, and W Vainchenker. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7:227–234, 2009.
- [7] Alessandra Borgognone and Fabio Maria Pulcinelli. Reduction of camp and cgmp inhibitory effects in human platelets by mrp4-mediated transport. *Thrombosis and haemostasis*, 108(11):955–962, 2012.
- [8] Ethan D Borre, Adam Goode, Giselle Raitz, Bimal Shah, Angela Lowenstern, Raneer Chatterjee, Lauren Sharan, Nancy M Allen LaPointe, Roshini Yapa, J Kelly Davis, et al. Predicting thromboembolic and bleeding event risk in patients with non-valvular atrial fibrillation: a systematic review. *Thrombosis and haemostasis*, 118(12):2171–2187, 2018.
- [9] Kay Brune and Paola Patrignani. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of pain research*, 8:105, 2015.
- [10] M Cattaneo. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5:230–237, 2007.
- [11] Marco Cattaneo. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(11):1980–1987, 2004.
- [12] B Chantemargue, Florent Di Meo, K Berka, N Picard, H Arnion, M Essig, P Marquet, M Otyepka, and P Trouillas. Structural patterns of the human abcc4/mrp4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacological research*, 133:318–327, 2018.
- [13] Satish B Cheepala, Aaron Pitre, Yu Fukuda, Kazumasa Takenaka, Yuanyuan Zhang, Yao Wang, Sharon Frase, Tamara Pestina, T Kent Gartner, Carl Jackson, et al. The abcc4 membrane transporter modulates platelet aggregation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(20):2307–2319, 2015.
- [14] Giovanni Davì and Carlo Patrono. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, 357(24):2482–2494, 2007.

- [15] Michael Dean, Yannick Hamon, and Giovanna Chimini. The human atp-binding cassette (abc) transporter superfamily. *Journal of lipid research*, 42(7):1007–1017, 2001.
- [16] N Di Giorgio. Fenomeni di oncosi controllata nelle piastrine durante la stabilizzazione del coagulo indotto da stimolo immunologico. 2006.
- [17] Brian Estevez and Xiaoping Du. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. *Physiology*, 32(2):162–177, 2017.
- [18] GARRET A FitzGerald, JOHN A Oates, JACEK Hawiger, RICHARD L Maas, L Jackson Roberts, JA Lawson, AR Brash, et al. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *The Journal of clinical investigation*, 71(3):676–688, 1983.
- [19] Christopher N Floyd and Albert Ferro. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacology & therapeutics*, 141(1):69–78, 2014.
- [20] DMM Fornasari and Pierangelo Lora Aprile. Dolore infiammatorio acuto in pazienti a rischio cardiovascolare in terapia con aspirina a basse dosi: una possibile opzione e un'ipotesi suggestiva. *Rivista SIMG*, 5:56–64, 2017.
- [21] SARA FRANCESCHI. La resistenza alla terapia antiaggregante: sviluppo di una metodologia” gel-free” per l’analisi proteomica delle piastrine. 2010.
- [22] GF Gensini, C Alamanni, and R Marcucci. La resistenza ai farmaci antiaggreganti: Vero o falso problema?
- [23] Thomas Gremmel, Andrew L Frelinger III, and Alan D Michelson. Platelet physiology. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, volume 42, pages 191–204. Thieme Medical Publishers, 2016.
- [24] Maria Luisa Guarino, Isabella Massimi, Laura Alemanno, Laura Conti, Dominick J Angiolillo, and Fabio M Pulcinelli. Mrp4 over-expression has a role on both reducing nitric oxide-dependent antiplatelet effect and enhancing adp induced platelet activation. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 51(3):625–632, 2021.

- [25] David Hardy, Roslyn M Bill, Anass Jawhari, and Alice J Rothnie. Functional expression of multidrug resistance protein 4 mrp4/abcc4. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, 24(10):1000–1008, 2019.
- [26] David Hardy, Roslyn M Bill, Alice J Rothnie, and Anass Jawhari. Stabilization of human multidrug resistance protein 4 (mrp4/abcc4) using novel solubilization agents. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, 24(10):1009–1017, 2019.
- [27] Michael Holinstat. Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(2):195–198, 2017.
- [28] Joseph Hung, Jules YT Lam, Lucie Lacoste, and Glaci Letchacovski. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation*, 92(9):2432–2436, 1995.
- [29] Gabriele Jedlitschky, Konstanze Tirschmann, Lena E Lubenow, Hendrik K Nieuwenhuis, Jan WN Akkerman, Andreas Greinacher, and Heyo K Kroemer. The nucleotide transporter mrp4 (abcc4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood*, 104(12):3603–3610, 2004.
- [30] Kerstin Jurk and Beate E Kehrel. Platelets: physiology and biochemistry. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, volume 31, pages 381–392. Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ... , 2005.
- [31] Nazish Khan, Mamas A Mamas, Alexandra Moss, Diana A Gorog, Peter Nightingale, Angel Armesilla, Andrew Smallwood, Shahzad Munir, Saib Khogali, Ben Wrigley, et al. Aspirin related platelet reactivity as a determinant of ten year survival in high risk non-st segment elevation myocardial infarction (nSTEMI) patients. *Thrombosis research*, 196:523–525, 2020.
- [32] Jyh-Yeuan Lee and Daniel M Rosenbaum. Transporters revealed. *Cell*, 168(6):951–953, 2017.
- [33] Jane A Leopold and Joseph Loscalzo. Emerging role of precision medicine in cardiovascular disease. *Circulation research*, 122(9):1302–1315, 2018.

- [34] Paola Roxana Lev, Nora Paula Goette, Ana Claudia Glembotsky, RP Laguens, PM Cabeza Meckert, Juan Pablo Salim, Paula Graciela Heller, Roberto Gabriel Pozner, Rosana Fernanda Marta, and Felisa Concepción Molinas. Production of functional platelet-like particles by the megakaryoblastic dami cell line provides a model for platelet biogenesis. *Platelets*, 22(1):26–36, 2011.
- [35] Li-Ming Lien, Zhih-Cherng Chen, Chi-Li Chung, Ting-Lin Yen, Hou-Chang Chiu, Duen-Suey Chou, Shih-Yi Huang, Joen-Rong Sheu, Wan-Jung Lu, and Kuan-Hung Lin. Multi-drug resistance protein 4 (mrp4/abcc4) regulates thrombus formation in vitro and in vivo. *European journal of pharmacology*, 737:159–167, 2014.
- [36] Kellie R Machlus and Joseph E Italiano. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*, 201(6):785–796, 2013.
- [37] Emanuela Marcantoni, Nicole Allen, Matthew R Cambria, Rebecca Dann, Michael Cammer, Tenzin Lhakhang, Meagan P O’Brien, Benjamin Kim, Tilla Worgall, Adriana Heguy, et al. Platelet transcriptome profiling in hiv and atp-binding cassette subfamily c member 4 (abcc4) as a mediator of platelet activity. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(1):9–22, 2018.
- [38] Luca Masotti. Endothelial pathophysiology, glycosaminoglycans and glycocalyx. *Clinical Management Issues*, 4(4S):5–16, 2010.
- [39] Isabella Massimi, Ambra Ciuffetta, Flavia Temperilli, Francesca Ferrandino, Alessandra Zicari, Fabio M Pulcinelli, and Maria Pia Felli. Multidrug resistance protein-4 influences aspirin toxicity in human cell line. *Mediators of inflammation*, 2015, 2015.
- [40] Isabella Massimi, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Valentina Lulli, Alessandra Borgognone, Federico Romani, Francesco Barillà, Carlo Gaudio, Marco Gabbianelli, Luigi Frati, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6):1343–1353, 2014.

- [41] Isabella Massimi, Lavinia Vittoria Lotti, Flavia Temperilli, Massimo Mancone, Gennaro Sardella, Simone Calcagno, Ombretta Turriziani, Luigi Frati, and Fabio M Pulcinelli. Enhanced platelet mrp4 expression and correlation with platelet function in patients under chronic aspirin treatment. *Thrombosis and haemostasis*, 116(12):1100–1110, 2016.
- [42] Teresa Mattiello, Raffaella Guerriero, Lavinia Vittoria Lotti, Elisabetta Trifirò, Maria Pia Felli, Alessandro Barbarulo, Bruna Pucci, Paola Gazzaniga, Carlo Gaudio, Luigi Frati, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(7):752–761, 2011.
- [43] Lena Oevermann, Jan Scheitz, Katharina Starke, Kathleen Köck, Thomas Kiefer, Gottfried Dölken, Juliane Nießen, Andreas Greinacher, Werner Siegmund, Marek Zygmunt, et al. Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of mrp4 (abcc4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *International journal of cancer*, 124(10):2303–2311, 2009.
- [44] Alf-Åge R Pettersen, Ingebjørg Seljeflot, Michael Abdelnoor, and Harald Arnesen. High on-aspirin platelet reactivity and clinical outcome in patients with stable coronary artery disease: results from ascet (aspirin nonresponsiveness and clopidogrel endpoint trial). *Journal of the American Heart Association*, 1(3):e000703, 2012.
- [45] Fabio M Pulcinelli, Teresa Maltese, and Flavia Temperilli. Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio.
- [46] Fabio M Pulcinelli, Pasquale Pignatelli, Andrea Celestini, Silvia Riondino, Pier Paolo Gazzaniga, and Francesco Violi. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(6):979–984, 2004.
- [47] FM Pulcinelli, S Riondino, A Celestini, P Pignatelli, E Trifiro, L Di Renzo, and F Violi. Persistent production of platelet thromboxane a₂ in patients chronically treated with aspirin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(12):2784–2789, 2005.

- [48] Michael A Rieger and Timm Schroeder. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12):a008250, 2012.
- [49] Christoph A Ritter, Gabriele Jedlitschky, Henriette Meyer zu Schwabedissen, Markus Grube, Kathleen Köck, and Heyo K Kroemer. Cellular export of drugs and signaling molecules by the atp-binding cassette transporters mrp4 (abcc4) and mrp5 (abcc5). *Drug metabolism reviews*, 37(1):253–278, 2005.
- [50] Letizia Riva, Giuseppe Di Pasquale, Gianni Casella, Daniela Calabrese, Silvia Zagnoni, and Maria Giovanna Pallotti. Antiaggreganti piastrinici nelle sindromi coronariche acute: stato attuale e prospettive future. *G Ital Cardiol*, 11(12 Suppl 3):27S–33S, 2010.
- [51] Frans GM Russel, Jan B Koenderink, and Rosalinde Masereeuw. Multidrug resistance protein 4 (mrp4/abcc4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in pharmacological sciences*, 29(4):200–207, 2008.
- [52] Joanna Saluk, Michal Bijak, Michal B Ponczek, and Barbara Wachowicz. The formation, metabolism and the evolution of blood platelets. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 68:384–391, 2014.
- [53] Janardhan Sampath, Masashi Adachi, Sigrid Hatse, Lieve Naesens, Jan Balzarini, Robin Flatley, Larry Matherly, and John Schuetz. Role of mrp4 and mrp5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci*, 4(3):22–30, 2002.
- [54] Karsten Schrör. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, volume 23, pages 349–356. Copyright© 1997 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1997.
- [55] H Schulze and RA Shivdasani. Mechanisms of thrombopoiesis. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 3(8):1717–1724, 2005.
- [56] SS Smyth, RP McEver, AS Weyrich, CN Morrell, MR Hoffman, GM Arepally, PA French, HL Dauerman, RC Becker, and 2009 Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(11):1759–1766, 2009.

- [57] Deepa Soodi, Jeffrey J VanWormer, and Shereif H Rezkalla. Aspirin in primary prevention of cardiovascular events. *Clinical Medicine & Research*, 18(2-3):89–94, 2020.
- [58] Ph G Steg, SH Dorman, and P Amarenco. Atherothrombosis and the role of antiplatelet therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9:325–332, 2011.
- [59] Tim Thijs, Benedicte P Nuyttens, Hans Deckmyn, and Katleen Broos. Platelet physiology and antiplatelet agents. 2010.
- [60] CB Thompson. From precursor to product: how do megakaryocytes produce platelets? *Progress in clinical and biological research*, 215:361–371, 1986.
- [61] Jonathan N Thon and Joseph E Italiano. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Antiplatelet Agents*, pages 3–22, 2012.
- [62] Megumi Tsukamoto, Shiori Sato, Kazuhiro Satake, Mizuki Miyake, and Hiroshi Nakagawa. Quantitative evaluation of drug resistance profile of cells expressing wild-type or genetic polymorphic variants of the human abc transporter abcc4. *International journal of molecular sciences*, 18(7):1435, 2017.
- [63] Megumi Tsukamoto, Miho Yamashita, Tsuyoshi Nishi, and Hiroshi Nakagawa. A human abc transporter abcc4 gene snp (rs11568658, 559 g_i t, g187w) reduces abcc4-dependent drug resistance. *Cells*, 8(1):39, 2019.
- [64] Gábor E Tusnády, Éva Bakos, András Váradi, and Balázs Sarkadi. Membrane topology distinguishes a subfamily of the atp-binding cassette (abc) transporters. *FEBS letters*, 402(1):1–3, 1997.
- [65] Paola EJ van der Meijden and Johan WM Heemskerk. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, 16(3):166–179, 2019.
- [66] J Verri and V Fuster. Mechanisms of acute ischemic syndromes and coronary atherosclerosis progression. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 68(6):461–467, 1997.
- [67] F Violi, P Pignatelli, and FM Pulcinelli. Aspirin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(2):338–339, 2004.

- [68] Massimo Volpe, Maurizio Giuseppe Abrignani, Claudio Borghi, Sergio Coccheri, Paolo Gresele, Giuseppe Patti, Bruno Trimarco, and Raffaele De Caterina. La terapia con aspirina nella prevenzione cardiovascolare primaria. documento di consenso intersocietario italiano. *Giornale Italiano di Cardiologia*, 15(7):442–451, 2014.
- [69] Adam Wiśniewski. Multifactorial background for a low biological response to antiplatelet agents used in stroke prevention. *Medicina*, 57(1):59, 2021.
- [70] JW Zhang, WW Liu, Timothy A McCaffrey, XQ He, WY Liang, XH Chen, XR Feng, Sidney W Fu, and ML Liu. Predictors of high on-aspirin platelet reactivity in elderly patients with coronary artery disease. *Clinical interventions in aging*, 12:1271, 2017.
- [71] Anne Zufferey, Pierre Fontana, Jean-Luc Reny, Severine Nolli, and Jean-Charles Sanchez. Platelet proteomics. *Mass spectrometry reviews*, 31(2):331–351, 2012.