

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

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

Indirizzo: Scienze Geriatriche ed Ematologiche

XXII° Ciclo

## *Studio dei fattori di rischio genetico nella Trombocitopenia da Eparina*

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore dell'Indirizzo e Supervisore: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Dottoranda: Dr.ssa Pamela Scarparo

15 Marzo 2010



## RIASSUNTO

La piastrinopenia indotta da eparina (HIT) è una rara e grave complicanza della terapia eparinica, caratterizzata da una marcata riduzione del numero delle piastrine (trombocitopenia) che può essere complicata nel 30-50% dei casi da episodi trombotici sia venosi che arteriosi (HITT). La letteratura al riguardo riporta che circa l'1% dei pazienti che ricevono Eparina standard o a basso peso molecolare sviluppano una trombocitopenia da eparina IgG-mediata.

L'eziologia della HIT dipende dalla formazione di anticorpi (Abs) rivolti contro un complesso formato da eparina (H), a dosi terapeutiche, e fattore piastrinico 4 (PF4). Gli immunocomplessi H/PF4/Abs che si legano al recettore piastrinico FcγRIIA, inducono attivazione piastrinica e aggregazione, modulando l'affinità della GpIIb/IIIa per il fibrinogeno. PECAM1 regola negativamente l'attivazione piastrinica mediata da FcγRIIA, anche se i meccanismi di tale inibizione non sono ancora stati del tutto chiariti. Le piastrine ricoperte da IgG sono poi riconosciute e rimosse dai macrofagi splenici per mezzo del recettore FcγRIIIA.

La HIT e la HITT non si sviluppano in tutti i pazienti che ricevano eparina, numerosi fattori potrebbero giocare un ruolo nella patogenesi: il tipo di eparina utilizzata, l'eterogeneità degli anticorpi, variazioni genetiche interindividuali (polimorfismi) e altri cofattori come stati infiammatori del paziente. In questo studio si sono presi in considerazione in particolare quattro differenti polimorfismi genetici che si trovano sui recettori precedentemente citati: FcγRIIA-H131R, GpIIb/IIIa-HPA1, PECAM1-L125V (in linkage disequilibrium con S563N e R670G) e FcγRIIIA-F158V.

L'obiettivo del presente lavoro, combinando studi immunologici, funzionali e genetici, è determinare se i polimorfismi genetici di alcuni recettori piastrinici e monocitari siano implicati nell'insorgenza della HIT o nelle complicanze trombotiche di questa patologia, a parità di presenza di anticorpi

E' stato utilizzato un test ELISA per determinare la presenza degli anticorpi H/PF4 nel plasma dei pazienti e successivamente un test HIPA per determinare se tali anticorpi fossero funzionalmente in grado di attivare le piastrine di donatori in vitro. Utilizzando lo score clinico delle 4T e i risultati dei test immunologico e funzionale, sono stati definiti tre gruppi di pazienti:

51 pazienti H/PF4/Ab, con anticorpi non in grado di attivare le piastrine, senza trombocitopenia.

50 pazienti HIT, con anticorpi funzionalmente in grado di attivare le piastrine e trombocitopenia.

53 pazienti HITT, con anticorpi funzionalmente in grado di attivare le piastrine, trombocitopenia e trombosi.

Per determinare il genotipo di tutti i pazienti per i quattro polimorfismi in analisi, sono state utilizzate diverse tecniche di biologia molecolare: per FcγRIIA-H131R, PECAM1-L125V e FcγRIIIA-F158V è stata messa a punto una PCR allele-specifica, per il polimorfismo HPA1, invece, una discriminazione allelica in real time PCR, utilizzando sonde Taqman.

Le differenze tra le frequenze alleliche e genotipiche dei tre gruppi di pazienti sono state analizzate con il test statistico del  $\chi^2$ . Successivamente è stata utilizzata una Multiple Regression Analysis per il confronto tra polimorfismi multipli. Prima di procedere all'analisi statistica è stato testato l'equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni polimorfismo.

Sono emerse alcune differenze significative confrontando le frequenze dei polimorfismi tra i tre gruppi di pazienti (H/PF4/Ab;HIT;HITT), in particolare tra il gruppo HIT e HITT. La frequenza del genotipo R/R (Fc $\gamma$ RIIA) è aumentata nel gruppo HITT ( $p < 0,05$ ), così come la frequenza del genotipo a/b (GpIIIa-HPA1) ( $p < 0,05$ ). Anche la frequenza del setting polimorfico VNG (V/V125-N/N563-G/G670) per il recettore PECAM1 è aumentata nel gruppo HITT rispetto agli altri gruppi, anche se non in modo statisticamente significativo. L'analisi multivariata ha mostrato che l'associazione tra R/R131 e a/b-HPA1 è in relazione con il gruppo HITT, con una  $p$  vicina alla significatività statistica (0,07). Non sono state invece rilevate differenze significative per i quattro polimorfismi analizzati tra il gruppo HIT e il gruppo H/PF4/Ab.

Possiamo quindi supporre che le piastrine R/R (per il recettore Fc $\gamma$ RIIA), eliminate in modo meno efficace delle H/H, rimangano in circolo più a lungo, portando ad un rischio trombotico maggiore nella HIT; tale rischio è aumentato anche dall'allele b di HPA1 (polimorfismo protrombotico per diverse patologie). Si può inoltre ipotizzare che il setting VNG per PECAM 1 possa avere un minor effetto inibitorio sul recettore Fc $\gamma$ RIIA. Insieme questi polimorfismi potrebbero creare un setting genetico che porti una maggior frequenza trombotica nella Trombocitopenia da eparina. Per l'associazione dei genotipi R/R e a/b con la HITT, abbiamo ottenuto un valore  $p = 0,07$  vicino alla significatività (Multivariate regression analysis); possiamo quindi supporre che aumentando la nostra casistica potremo riuscire ad ottenere un'associazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## SUMMARY

Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is a rare and life threatening complication of heparin therapy, characterized by great reduction of platelet's count, that may be complicated in 30-50% of cases by a paradoxical thrombotic syndrome (HITT), either arterial or venous. As reported by major clinical series in the literature, about 1% of patients receiving unfractionated heparin (UFH) or low molecular weight heparin (LMWH) develop IgG-mediated heparin-induced thrombocytopenia. HIT pathogenesis can be due to antibodies (Abs) formation, which are direct against a complex formed by Heparin (H) and PF4. H/PF4 antibodies bind the platelets receptor FcγRIIA, inducing platelet activation and aggregation, by modulating the affinity of GpIIb-IIIa for fibrinogen and induce release of platelet granules. PECAM-1 has been shown to negatively regulate platelet activation downstream FcγRIIA, but the mechanism of this process is still unclear. Moreover the receptor FcγRIIIA, expressed on macrophages, seems to play an important role on the clearance of IgG-coated platelets.

However HIT and HITT does not develop in all patients, different factors may play a role in the onset of clinical syndrome, like: heparin type, antibodies functionality, individual genetic variations (genetic polymorphisms), and in vivo cofactors, such as local trauma. In particular we have studied four different polymorphisms, located in the four receptor previously described: FcγRIIA-H131R, GpIIb/IIIa-HPA1, PECAM1-L125V (in linkage disequilibrium with S563N and R670G) and FcγRIIIA-F158V.

The aim of the present study is to understand if polymorphisms of platelets receptors may influence the clinical features of patients who develop H/PF4/Abs, combining immunological, functional and genetic studies. In particular our aim is to discover why some patients with Abs develop HIT syndrome, with or without thrombotic complications, while other not.

First we used ELISA commercial test to determine the presence of H/PF4 antibodies in the plasma samples, than we used HIPA as functional test to understand whether the antibodies found were or not able to activate donor's platelets. Using the 4T score for HIT and the result of immunological and functional test, we define three groups of patients:

51 H/PF4/Ab patients, with antibodies not able to activate platelets and without thrombocytopenia.

50 HIT patients with antibodies able to activate platelets and thrombocytopenia

53 HITT patients with antibodies able to activate platelets, thrombocytopenia and thrombosis.

We used molecular biology techniques to determine the genotype for the four polymorphisms previously described, in particular: for FcγRIIA-H131R, PECAM1-L125V and FcγRIIIA-F158V we perform an allele-specific PCR, and for HPA1 polymorphism we set an allelic discrimination real time PCR using taqman probes.

Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism. Allele or genotype frequencies between patients and controls were compared by the  $\chi^2$  test. Then we use Multiple Regression analysis for multiple confront between different polymorphisms.

Comparing the polymorphisms frequencies between the three patients groups (H/PF4/Ab;HIT;HITT) we found some significant differences, in particular between HIT and HITT group. The frequency of the R/R131 genotype (Fc $\gamma$ R1IA) is increased in HITT group ( $p < 0,05$ ), the same for the a/b genotype frequency (GpIIIa-HPA1) ( $p < 0,05$ ). The frequency of the polymorphic setting VNG (V/V125-N/N563-G/G670) for the PECAM receptor is also increased in the HITT group compare with the other two groups, but the p value is not statistically significant. We found that R/R131 associated with a/b-HPA1 have a relation with HITT but with a p-value (0,07) near significance.

There were no great differences between the genotypes of the four polymorphisms comparing HIT group with H/PF4/Ab group.

We suppose that platelets R/R for the receptor Fc $\gamma$ R1IA, cleared less efficiently than H/H ones, can circulate longer enhancing the risk for HIT thrombosis. We can suggest that the setting VNG for PECAM1 can have less inhibitory activity on Fc $\gamma$ R1IA receptor. Furthermore the b allele for the HPA1 polymorphism is a known risk factor for thrombosis.

Together these polymorphisms could create a genetic setting that could enhance thrombotic complications in HIT pathology. We found a p value = 0,07, near significance, for the association of R/R and a/b with HITT (Multiple regression analysis), we think that increasing our cases we could obtain a significant association (p value  $< 0,05$ ).

## INDICE

<b>Abbreviazioni</b>	.....	<b>pag. 9</b>
<b>Introduzione:</b>	.....	<b>pag.11</b>
<b>Obiettivo della tesi:</b>	.....	<b>pag.31</b>
<b>Pazienti:</b>	.....	<b>pag.33</b>
<b>Materiali e Metodi:</b>	.....	<b>pag.35</b>
<b>Risultati:</b>	.....	<b>pag.47</b>
<b>Discussione:</b>	.....	<b>pag.59</b>
<b>Conclusioni:</b>	.....	<b>pag.69</b>
<b>Bibliografia:</b>	.....	<b>pag.71</b>





## ABBREVIAZIONI

<b>AA</b>	Aminoacido
<b>Ab</b>	Antibody - Anticorpi
<b>ACD</b>	Citrato Destrosio acido
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMSO</b>	Dimetil Solfossido
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (EIA)
<b>F</b>	Fenilalanina (Phe)
<b>FcγRIIA</b>	Recettore per la porzione Fc delle immunoglobuline tipo due A
<b>FcγRIIIA</b>	Recettore per la porzione Fc delle immunoglobuline tipo tre A
<b>For</b>	Forward
<b>FX</b>	Fattore Decimo della coagulazione
<b>G</b>	Glicina (Gly)
<b>GAG</b>	Glicosamminoglicani
<b>Gp</b>	Glicoproteina
<b>GpIIb/IIIa</b>	Recettore per il Fibrinogeno
<b>H</b>	Heparin - Eparina
<b>H/PF4/Ab</b>	Anticorpi contro Eparina e Pf4
<b>H</b>	Istidina (His)
<b>HIPA</b>	Heparin-induced platelet activation
<b>HIT</b>	Heparin-induced thrombocytopenia
<b>HITT</b>	Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis
<b>ITAM</b>	Immune-tyrosine based activating motif- motivo attivatorio
<b>ITIM</b>	Immune-tyrosine based inhibitory motif-motivo inibitorio
<b>L</b>	Leucina (Leu)
<b>LMWH</b>	Low molecular weight heparin - Eparina a basso peso molecolare
<b>MM</b>	Master mix
<b>N</b>	Asparagina (Asp)
<b>NAIT</b>	Neonatal alloimmune thrombocytopenia
<b>nm</b>	Nano metri

<b>NK</b>	Cellule natural killer
<b>O.D.</b>	Densità Ottica
<b>P</b>	Prolina (Pro)
<b>PAT</b>	Platelet aggregation test
<b>pb</b>	Paia di basi
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction, reazione a catena della polimerasi
<b>PECAM1</b>	Molecola di adesione endotelio-piastrine
<b>PF4</b>	Fattore Piastrinico 4
<b>PLTS</b>	Piastrine
<b>PNPP</b>	p-nitrofenilfosfato
<b>PPP</b>	Plasma Povero di Piastrine
<b>PRP</b>	Plasma Ricco di Piastrine
<b>PVS</b>	Polivinil solfato
<b>R</b>	Arginina
<b>Rev</b>	Reverse
<b>S</b>	Serina (Ser)
<b>SRA</b>	Serotonine release assay
<b>TF</b>	Tissue Factor
<b>TMB</b>	Tetra-metil benzidina
<b>V</b>	Valina (Val)
<b>vWF</b>	Fattore di Von Willebrand
<b>WP</b>	Washed platelets
<b>WT</b>	Wild Type

## INTRODUZIONE

### La trombocitopenia indotta da Eparina (HIT)

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) fu descritta per la prima volta circa 50 anni fa (Wiesmann RE , 1958).

La HIT è una rara, grave e idiosincrasica complicanza della terapia eparinica, caratterizzata da una marcata riduzione del numero delle piastrine (trombocitopenia) associata in circa il 50% dei casi a complicanze trombotiche sia venose che arteriose.

E' la forma più frequente di trombocitopenia indotta da farmaci e la più grave complicanza della terapia eparinica.

Sono descritti due tipi di HIT. La HIT di tipo I può insorgere durante i primi 2-3 giorni di trattamento con eparina ed è caratterizzata da lieve e transitoria trombocitopenia con piastrine raramente inferiori alle  $100 \times 10^9/L$  che ritornano ai valori basali senza la sospensione del farmaco. Si ritiene che tale forma di trombocitopenia sia dovuta ad un fenomeno di "clumping" indotto dall'eparina; non interviene il sistema immunitario e le manifestazioni patologiche sono rare (Fabris et al, 2000).

Nella HIT di tipo II il meccanismo della trombocitopenia è immunomediato. Il calo della conta piastrinica (>30%) avviene da 5 a 10 giorni dopo l'inizio della terapia con eparina, o anche prima se il paziente è stato precedentemente esposto al farmaco (Warkentin TE et al, 2003). Se la terapia eparinica è sospesa, il recupero piastrinico avviene di solito in 5-7 giorni, anche se sono stati osservati occasionalmente periodi maggiori.

### Quadro clinico

Come già brevemente accennato, la tipica presentazione della HIT II (che indicheremo semplicemente come HIT) è la riduzione della conta piastrinica

(>30%) nei 5-10 giorni dopo l'inizio della terapia eparinica. Ciò è indipendente dal tipo di eparina somministrata, dalla dose e dalla via di somministrazione. Nonostante la trombocitopenia, le manifestazioni emorragiche non sono frequenti, mentre la maggiore complicanza clinica è la trombosi. La HIT si associa a trombosi arteriose e venose (HITT) nel 50% dei casi ed in circa la metà di questi pazienti essa viene diagnosticata proprio per la presenza di un nuovo evento trombotico (Warkentin TE et al, 1996). Il 40-50% dei rimanenti pazienti con trombocitopenia isolata sviluppa trombosi se trattato in solo modo conservativo sospendendo l'eparina, non è infatti sufficiente sospendere immediatamente il trattamento eparinico, ma deve essere utilizzato un altro anticoagulante non in grado di interagire con gli anticorpi (Wallis DE, 1999). Le trombosi arteriose sono più frequenti in pazienti cardiovascolari, mentre quelle venose nei pazienti sottoposti a profilassi postchirurgica. Le complicanze trombotiche arteriose maggiormente osservate sono le trombosi dei grandi vasi con gangrena e amputazione dell'arto, lo stroke, l'infarto miocardio e trombosi intracardiaca (Wallis DE et al 1999). Le trombosi venose comprendono trombosi venose profonde, embolia polmonare, trombosi dei seni venosi cerebrali e chiusura della fistola aterovenosa in paziente dializzato (Fondu P et al, 1995). Le casistiche mostrano che in più del 60% dei casi di HITT coesistono altri fattori protrombotici come diabete, neoplasie, insufficienza cardiaca, lupus eritematoso sistemico, sindrome antifosfolipidi, infezioni e traumi. Possono inoltre osservarsi manifestazioni allergiche, necrosi cutanee, necrosi emorragica delle ghiandole surrenali e coagulazione intravascolare disseminata (Fondu P et al, 1995).

### **Epidemiologia**

La frequenza di HIT è variabile e dipende da diversi fattori: tipo di eparina, durata del trattamento, dosi utilizzate, tipo di paziente. Ulteriore elemento di rischio da considerare è la recente esposizione all'eparina (nei precedenti 100

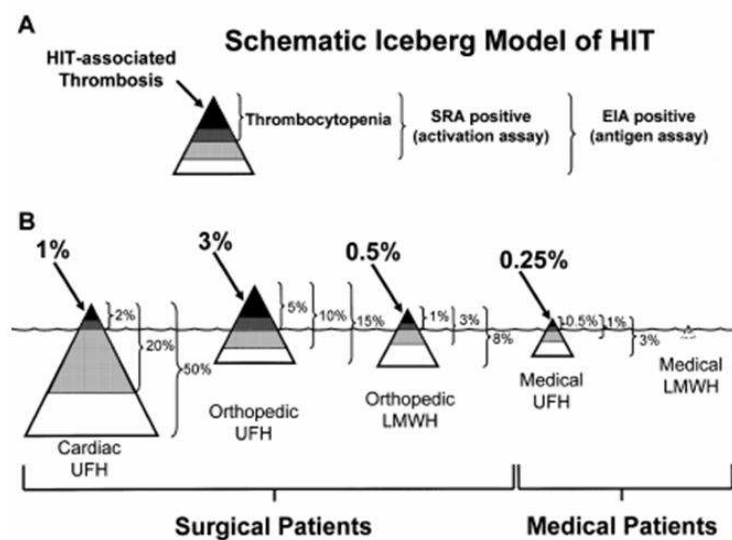
giorni). In uno studio di Warkentin del 1999 l'incidenza della HIT era del 5% con dosaggi terapeutici di eparina bovina e del 1% con eparina porcina, mentre era inferiore all'1% con dosaggi profilattici di eparina porcina (Warkentin TE et al, 1999). La HIT è più frequente in pazienti ortopedici che chirurgici, e meno comune in pazienti medici o ostetrici; le donne gravide sviluppano la HIT con incidenza molto minore rispetto a donne non in gravidanza anche con uso di UFH per lunghi periodi (Fausett et al 2001). La HIT è più comune con eparina non frazionata (UFH) che con l'uso di eparine a basso peso molecolare (LMWH) di almeno 8-10 volte (Warkentin TE, 2003); gli anticorpi si formano più spesso in pazienti di reparti medici che ricevono UFH rispetto a LMWH (Lindhoff-Last et al, 2002). Un nostro studio prospettico ha dimostrato che l'incidenza della HIT nei pazienti trattati con eparina sottocute (UFH) è dello 0,8%, più bassa di quella riscontrata per eparina somministrata per via endovenosa, ma con lo stesso elevato rischio di complicanze trombotiche (60%) (Girolami B et al, 2003); la stessa frequenza di HIT dello 0,8% è stata riscontrata in uno studio prospettico condotto su pazienti medici che ricevevano LMWH (Prandoni P et al, 2005).

I pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca sviluppano più frequentemente anticorpi rispetto ai pazienti ortopedici, tuttavia sono i pazienti ortopedici con anticorpi che hanno un maggior rischio di sviluppare HIT (Warkentin et al, 2000) (fig.1).

I pazienti sottoposti a interventi cardiocirurgici in circolazione extracorporea, costituiscono una popolazione estremamente interessante ai fini della ricerca sulla fisiopatologia della HIT, essi infatti vengono sottoposti a trattamento con UFH durante questo tipo di intervento. In questa popolazione si riscontra una grande percentuale di sierconversione, cioè comparsa di anticorpi contro il complesso H/PF4, ma senza segni clinici di trombocitopenia o trombosi. La comparsa di anticorpi anti H/PF4 in un numero maggiore di pazienti sembra strettamente riconducibile ad un massivo rilascio di PF4 dalle piastrine durante la circolazione extracorporea (Warkentin TE, 2000). La letteratura al riguardo

riporta una percentuale di sieroconversione dopo l'intervento tra il 30 ed il 40% a fronte di un'incidenza di HIT pressochè identica a quella di altre popolazioni, cioè attorno al 2%.

In figura 1 è rappresentato il modello ad "Iceberg" proposto da Warkentin che riassume le diverse incidenze di sieroconversione, con comparsa di anticorpi anti H/PF4, e di trombocitopenia associata o meno a complicanze trombotiche, nelle diverse categorie di pazienti sottoposti a terapia con UFH o LMWH.



**Figura1: Iceberg model della HIT**, da Warkentin TE, review 2003, British Journal of Haematology. Pannello A: Modello iceberg che mostra la relazione tra gli anticorpi anti H/PF4 (test ELISA-EIA positivo, vedi testo), gli anticorpi funzionalmente attivi (test funzionale SRA positivo, vedi testo), i pazienti con Trombocitopenia (HIT) e quelli con Trombocitopenia e Trombosi (HITT). Pannello B: Il rischio di sviluppare anticorpi, HIT o HITT dipende dal tipo di Eparina, UFH o LMWH, e dal tipo di pazienti che la ricevono.

### Insorgenza

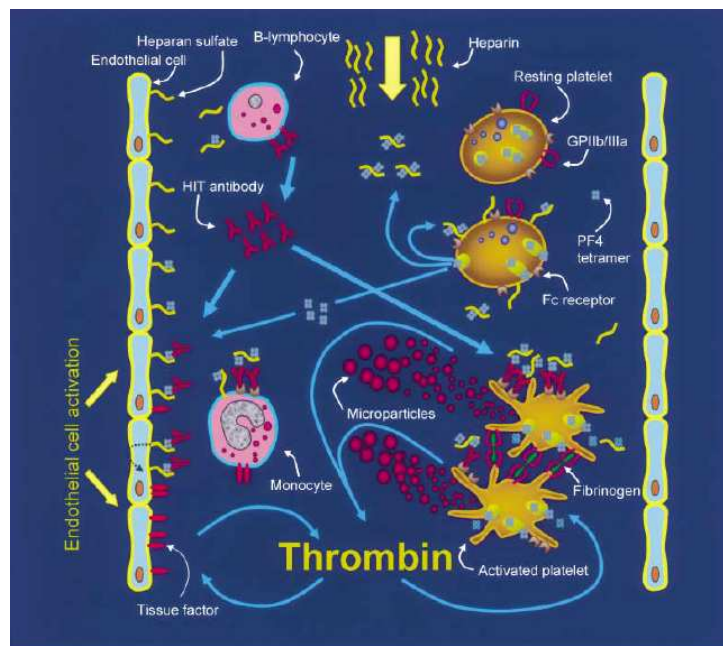
Sul piano patogenetico, la HIT si caratterizza per uno stato protrombotico immuno-mediato multifattoriale, associato ad un'abnorme generazione di trombina. Gli anticorpi che si generano, principalmente di classe IgG, sono rivolti contro un complesso formato da eparina, a dosi terapeutiche (concentrazioni di eparina variabili da 0.1-1 UI/mL), e fattore piastrinico 4 (PF4).

Nei pazienti HIT sono spesso presenti anche anticorpi di classe IgM e IgA, ma non è noto se siano in grado di causare la patologia, in assenza di IgG (Warkentin TE, 2003). Nel siero di pazienti HIT sono variamente presenti tutte le sottoclassi di IgG, alcune più comuni di altre (IgG1 > IgG3 > IgG2 > IgG4) (Denomme GA et al, 1997).

Il PF4 è una proteina di 7.8 KDa, che conta 70 aminoacidi; è contenuta nei granuli  $\alpha$  piastrinici, legata a GAG come il condroitin solfato. In condizioni normali, nel plasma sono presenti solamente tracce di PF4, infusioni di eparina aumentano i livelli di 15- 30 volte, staccando il PF4 dalla superficie delle cellule endoteliali (Warkentin TE, 2003). L'eparina, carica negativamente, si lega al PF4, proteina a carica positiva, inducendone cambiamenti conformazionali che favoriscono la formazione di tetrameri o ottameri compatti e l'esposizione di due nuovi epitopi. Perché avvenga la formazione del complesso H/PF4, sono necessarie concentrazioni ottimali di PF4 ed eparina in un rapporto stechiometrico di circa 2:1. Il complesso H/PF4 induce la formazione di anticorpi (Ab) che si legano al complesso attraverso i due nuovi epitopi così da formare un immunocomplesso H/PF4/Ab. In presenza di alte concentrazioni di eparina il legame degli anticorpi al complesso H/PF4 viene distrutto (Chong BH 2003; Warkentin TE, 2003). In seguito al legame dell' immunocomplesso H/PF4/Ab con le piastrine, queste vanno incontro ad attivazione e rilasciano altro PF4, una sorta di circuito a feedback positivo. Tale legame porta sia alla formazione di microaggregati piastrinici con successiva rimozione splenica (da cui la piastrinopenia), sia all'attivazione delle piastrine stesse con conseguente formazione di trombina (Fabris F e al, 1997). Numerosi altri meccanismi sono coinvolti nell'abnorme formazione di trombina, così da favorire eventi trombotici nella HIT, come il rilascio di microparticelle procoagulanti da parte delle piastrine attivate, il danneggiamento dell'endotelio da parte di PF4 con esposizione di tissue factor (TF), e un'aumento di sintesi e rilascio di TF dai monociti indotto dagli anticorpi. Gli immunocomplessi sono anche in grado di causare un danno diretto delle cellule endoteliali con aumentata espressione di

P-selectina, E-selectina e VCAM-I. La presenza di queste molecole sulla superficie delle cellule endoteliali in quantità aumentata favorirebbe l'adesione dei monociti e la reazione a catena che ha come end point la formazione del trombo (Blank M et al, 2001) (Fig.2). Lo stato procoagulante indotto persiste per molti giorni anche dopo la sospensione dell'eparina.

L'attivazione piastrinica avviene attraverso il legame dei complessi H/PF4/Ab con il recettore FcγRIIA (Fabris F et al, 2000), le piastrine sensibilizzate con IgG sono poi riconosciute e rimosse dai macrofagi splenici per mezzo del recettore FcγRIIA (Gruel et al, 2004). Il coinvolgimento del recettore per gli immunocomplessi FcγRIIA è stato dapprima dimostrato tramite studi in vitro con l'uso di anticorpi monoclonali che bloccassero tale recettore (Kelton et al, 1988), e successivamente con studi su animali modello. Per sviluppare una sindrome HIT il topo necessitava della presenza del recettore FcγRIIA, dell'eparina, e del PF4 (Reilly MP et al, 2001).



**Figura 2: Patogenesi della HIT** da Warkentin TE, review 2003, British Journal of Haematology. L'Eparina si lega al PF4 causandone un cambio conformazionale. Gli anticorpi riconoscono neoepitopi sul PF4, e formano l'immunocomplesso H/PF4/Ab che si lega alle piastrine via FcγRIIA receptor, attivando le piastrine e portando al rilascio di microparticelle pro aggreganti. La piastrine attivate rilasciano inoltre altro PF4 dai granuli alpha portando ad un circuito feed back positivo.



## Diagnosi di HIT: CLINICA

Una corretta diagnosi deve avvalersi di criteri sia clinici che basati sul risultato dei test di laboratorio.

Il sospetto clinico di HIT dovrebbe essere posto ogniqualvolta si abbia un paziente con piastrinopenia (intesa come  $PLTs < 150.000 \text{ mm}^3$  o calo delle PLT di almeno il 50% rispetto al conteggio basale) in trattamento eparinico da almeno 5 giorni (o meno se è già stato esposto a eparina negli ultimi 100 giorni), in assenza di altre cause note che possano provocare un calo del numero di piastrine. Inoltre si dovrebbe eseguire un conteggio piastrinico per sospetto di HIT in pazienti in trattamento con eparina da almeno 5 giorni che sviluppino un'improvvisa complicanza tromboembolica. Poiché nei pazienti chirurgici si assiste sovente a una trombocitosi reattiva post-operatoria, il valore "basale" da considerare per valutare l'eventuale calo piastrinico dovrebbe essere il picco post-chirurgico (Warkentin TE et al, 2001).

Esistono numerosi score clinici sviluppati e utilizzati per valutare l'efficacia di nuovi test diagnostici per la determinazione degli anticorpi H/PF4, ma solo il 4T score e lo score di Lillo-Le Louet sono stati valutati prospetticamente. Le evidenze riguardanti lo score di Lillo-Le Louet sono però limitate ad un singolo studio (Lillo-Le LA, 2004), di soli 84 pazienti in ambito cardiocirurgico, che non consente di trarre conclusioni certe. Il 4T score è stato valutato invece in tre studi prospettici e in uno studio retrospettivo. Negli studi prospettici (Lo GK et al, 2006; Pouplard C et al 2007; Briant A et al 2008) sono stati valutati complessivamente 326 pazienti consecutivi con sospetta HIT nel primo, 213 e 246 pazienti nel secondo e nel terzo. I risultati dello score clinico sono stati confrontati con quelli dei test specifici di laboratorio, eseguiti centralmente, in cieco, utilizzando sia un metodo immunologico che uno funzionale nel primo studio, e solo il funzionale nel secondo e nel terzo (SRA, serotonine release assay). La diagnosi di HIT era confermata se ambedue i test, immunologico e funzionale, risultavano positivi. Si è registrato un altissimo valore predittivo negativo (VPN, tra 97% e 100%). Un VPN del 100% è stato evidenziato anche in un recente studio retrospettivo (Denys B et al, 2008) che ha incluso 120 pazienti

con diagnosi di HIT confermata mediante citofluorimetria (FCA). In tabella 1 sono riportati i criteri di assegnazione degli score, dal lavoro di Lo G pubblicato sul Journal of Thrombosis and Haemostasis nel 2006 (Tab 1).

**Tabella 1: 4T score** da Lo GK et al, J Thromb Haemost 2006:

Sulla base del punteggio calcolato: per i pazienti con score inferiore a 3 la diagnosi di HIT è improbabile, tra 4-6 è possibile, con score maggiore di 6 la diagnosi è altamente probabile.

	<b>2 punti</b>	<b>1 punto</b>	<b>0 punti</b>
<b>Trombocitopenia</b>	caduta $\geq 50\%$ , o nadir $20-100 \times 10^9/l$	caduta 30-50%, o nadir $10-19 \times 10^9/l$	caduta $<10\%$ o nadir $<10 \times 10^9/l$
<b>Timing piastrinopenia</b>	5-10 gg, o $\leq 1g$ se eparina nei precedenti 30 gg	$>10$ gg, o $\leq 1g$ se eparina nei precedenti 30-100 gg	$\leq 1$ giorno (no eparina)
<b>Trombosi o altre complicanze</b>	Trombosi, necrosi cutanea, reazione sistemica post-bolo	Trombosi asintomatica, ricorrente, progressiva. Lesioni eritematose	no
<b>Altre cause di Trombocitopenia</b>	Escluse	possibili	definite

### Diagnosi di HIT: Test di laboratorio

Esistono due gruppi di test di laboratorio per la diagnosi della trombocitopenia da Eparina: i test di tipo immunologico sono utili a determinare la presenza degli anticorpi anti Eparina-PF4; mentre i test funzionali sono in grado di valutare la funzionalità di tali anticorpi in vitro con l'uso di piastrine sane da donatori.

## Metodi immunologici

### *PF4/eparina ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):*

Esistono essenzialmente due tipi di ELISA per la ricerca di anticorpi anti H/PF4: il primo utilizza come antigene il complesso H/PF4, il secondo il complesso tra PF4 e altri polianioni non eparinici (in genere Polivinil Sulfonato, PF4/PVS). In uno studio del 2001 è stato utilizzato per la prima volta il complesso PF4-PVS come antigene confrontandolo con H/PF4 e SRA sui sieri di 312 pazienti consecutivi con sospetto clinico di HIT; la concordanza tra i due ELISA è risultata perfetta (Visentin GP et al 2001). Principio del metodo: il plasma da testare è posto nei pozzetti di una micropiastra nei quali è coattato il complesso eparina/PF4 (o PF4/PVS) (rapporto 1:2). Vengono rivelate le IgG/IgA/IgM (insieme o separatamente a seconda dei test) dirette contro il complesso eparina/PF4 (Collins JL, Blood 1997). E' un metodo che ha dimostrato una sensibilità maggiore rispetto ai test funzionali, facile e rapido, che non richiede l'utilizzazione di piastrine da donatore. E' molto sensibile, ma poco specifico.

Studi recenti hanno dimostrato come per migliorare la specificità dei test ELISA debbano essere considerati due aspetti: la classe anticorpale valutata e il titolo anticorpale (espresso come densità ottica). Relativamente alla classe anticorpale, molti dei sistemi in commercio valutano la simultanea presenza di anticorpi di tutte e 3 le classi (IgG, IgM e IgA) sebbene, ai fini dell'attivazione e aggregazione piastrinica, siano importanti soprattutto le IgG. L'utilizzo di ELISA specifici per la sola classe IgG permette di migliorare la specificità del metodo (Warkentin TE, 2003). Per quanto riguarda i titoli anticorpali, in diversi studi sono risultati più elevati in pazienti con HIT o HITT rispetto ai pazienti con anticorpi senza piastrinopenia (fabris et al, 2002; Warkentin TE 2008). Sul piano fisiopatologico questa osservazione trova giustificazione nel fatto che più alto è il titolo anticorpale, maggiore sarà la generazione di trombina e il conseguente stato protrombotico. Pertanto, innalzare il cut-off della densità

ottica (es. da 0,4 a 1,0), potrebbe aumentare la specificità del metodo, riducendo il numero dei falsi positivi ed ottenendo una migliore correlazione con la positività ai test funzionali (SRA) (Warkentin TE, 2008).

*Metodo rapido con microbiglie (ID-H/PF4 Test):* Usa particolari microbiglie rosse in polistirene coattate con complessi eparina-PF4. Il siero del paziente e la sospensione di microbiglie vengono posti in microcolonne ad incubare per 5 minuti. Le microcolonne sono successivamente centrifugate. La positività del test è data dall'agglutinazione delle microbiglie che rimangono nella parte alta della colonna. Facile e rapido, risulta però meno sensibile e specifico dei test ELISA classici.

#### Metodi funzionali

Li test funzionali sono considerati più specifici dei test immunologici in quanto, valutando direttamente l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, non sono influenzati dall'eventuale presenza di IgA e IgM. Tali metodi utilizzano PRP (Plasma ricco di piastrine) o piastrine lavate (WP) da donatori, che vengono messe a contatto con il plasma o il siero da testare del paziente, in presenza di diverse concentrazioni di Eparina. Se gli anticorpi presenti nel plasma del paziente sono funzionali, essi attiveranno le piastrine in presenza di dosi terapeutiche di eparina, mentre non le attiveranno in eccesso di Eparina (un eccesso di Eparina infatti si comporta da competitore spiazzando gli immunocomplessi). I vari saggi utilizzano metodi diversi per determinare l'eventuale attivazione o aggregazione delle piastrine. Al fine di migliorare sensibilità e specificità delle metodiche è indicato utilizzare piastrine lavate in luogo di PRP. I test che usano piastrine lavate si sono dimostrati più sensibili perché il plasma è ricco di IgG e di altre proteine inibitorie (Warkentin TE et al, 1992). I saggi funzionali sono test complessi che richiedono personale specializzato e che pertanto non sono disponibili ovunque. Il loro non dovrebbe essere quindi un utilizzo di routine ma limitato solo a pochi casi selezionati.

Il test di rilascio della serotonina (SRA) marcata con  $^{14}\text{C}$  è stato il primo test messo a punto e, per questo, da sempre considerato il gold standard. In tempi più recenti l' "Heparin-Induced Platelet Activation" (HIPA) e la citofluorimetria (FCA), usando come marcatori di attivazione piastrinica l'annessina V, un anticorpo anti-CD62 (p-selettina) o il rilascio di microparticelle procoagulanti, hanno dimostrato sensibilità e specificità comparabili a quelli di SRA. Di minore rilevanza è il test di aggregazione piastrinica (PAT), perché ha sensibilità e specificità inferiori anche ai test immunologici.

Per tutti questi test esiste una variabilità dovuta all'uso di diversi donatori di piastrine, la reattività delle piastrine varia infatti da donatore a donatore; pertanto, per ottenere il massimo della sensibilità, è importante utilizzare piastrine provenienti da almeno 4 donatori diversi.

*Test di aggregazione piastrinica (PAT):* il plasma del paziente HIT da testare è messo in contatto col PRP dei donatori e con eparina (bassa e alta concentrazione). Viene misurata l'aggregazione indotta, secondo metodo di Born (Kelton, 1988). Il test è di facile esecuzione, ma di ridotta sensibilità.

*Test di release della  $^{14}\text{C}$ -serotonina ( $^{14}\text{C}$ -SRA):* E' il gold standard. Il siero da testare del paziente HIT è messo in contatto con le piastrine lavate (WP) dei donatori marcate con  $^{14}\text{C}$ -serotonina e con eparina a bassa ed elevata concentrazione. Viene misurato il rilascio all'esterno della  $^{14}\text{C}$ -serotonina. Il test è molto sensibile (94%) tuttavia presenta, lo svantaggio dell'utilizzo di sostanza radioattiva (Sheridan D, 1986).

*Attivazione delle piastrine indotta dall'eparina (HIPA):* il siero da testare è unito alle piastrine lavate (WP) dei donatori e ad eparina a bassa ed elevata

concentrazione. Viene visualizzata l'aggregazione delle piastrine in agitazione. Il metodo è facile da eseguire e sensibile (Greinacher A, 1991).

*Metodo citofluorimetrico (FCA):* il plasma (o siero) da testare è cimentato con il PRP dei donatori ed eparina a bassa ed elevata concentrazione. Viene misurata l'attivazione delle piastrine mediante binding dell'annexina V o l'esposizione di P-selectina, con l'uso di anticorpi monoclonali. Il metodo è rapido da eseguire, presenta però lo svantaggio dell'uso di costosi anticorpi monoclonali (Tomer A, 1997).

### **Genetica della HIT**

Nonostante la patogenesi della HIT sia stata ampiamente studiata, non tutti i pazienti che sviluppano anticorpi anti eparina-PF4 (H-PF4 Ab) vanno poi incontro alla trombocitopenia, inoltre solo alcuni di questi sviluppano le complicanze tromboemboliche della HIT (HITT). Numerosi fattori potrebbero giocare un ruolo nella patogenesi: il tipo di eparina utilizzata, l'eterogeneità degli anticorpi, variazioni genetiche interindividuali e altri cofattori come stati infiammatori del paziente (Fabris et al, 2002). Alcuni **polimorfismi** sembrano essere coinvolti nell'insorgenza o meno della piastrinopenia, o nella comparsa di uno stato protrombotico che porti alle complicazioni della HIT. Tali polimorfismi coinvolgono sia recettori implicati nel riconoscimento degli immunocomplessi, come i già citati FcγRIIA piastrinico e FcγRIIIA sui macrofagi, che altre proteine implicate nel processo di inibizione del segnale che si origina da tali recettori, come PECAM-1.

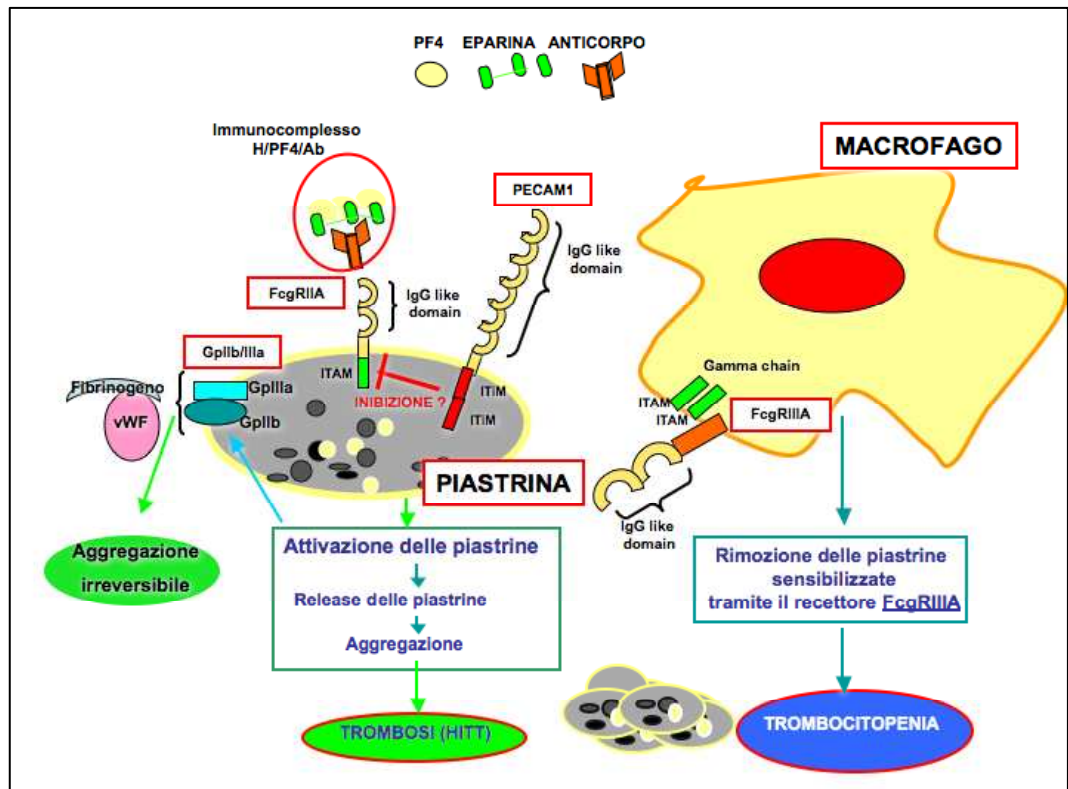


Figura 3: Recettori in studio: posizione e ruolo

### FcγRIIA

FcγRIIA è il recettore per gli immunocomplessi composti da IgG, presente sulla membrana di fagociti mononucleati, neutrofili e piastrine. Il recettore, monomero, è composto da due domini extracellulari Ig-like, un dominio transmembrana, e un dominio intracellulare che trasduce il segnale (fig 3). Il gene che codifica per tale recettore è composto da sette esoni, corrispondenti ad un polipeptide di 316 aminoacidi, per un totale di circa 40 KDalton. I primi due esoni codificano per il peptide segnale, l'esone 3 e il 4 per i due domini Iglike, l'esone 5 per la parte transmembrana e gli esoni 6 e 7 per il dominio intracellulare (Fig.4). L'esone 7 contiene un dominio ITAM (tyrosine-based activation model: YxxLx(12)YxxL), responsabile dell'attivazione del segnale intracellulare.

In seguito ad attivazione, il recettore dimerizza e viene fosforilato in tirosina ad opera di una chinasi Src (Luanfeng P et al 2003), ed agisce quindi come sito di riconoscimento per proteine con domini SH2 come Syk; la cascata fosforilativa porta poi ad effetti cellulari attraverso l'attivazione della fosfolipasi C (Canobbio I et al, 2006) . Il clustering di FcγRIIA induce shape change, secrezione dei granuli piatrinici, e aggregazione piastrinica (Luanfeng P et al 2003).

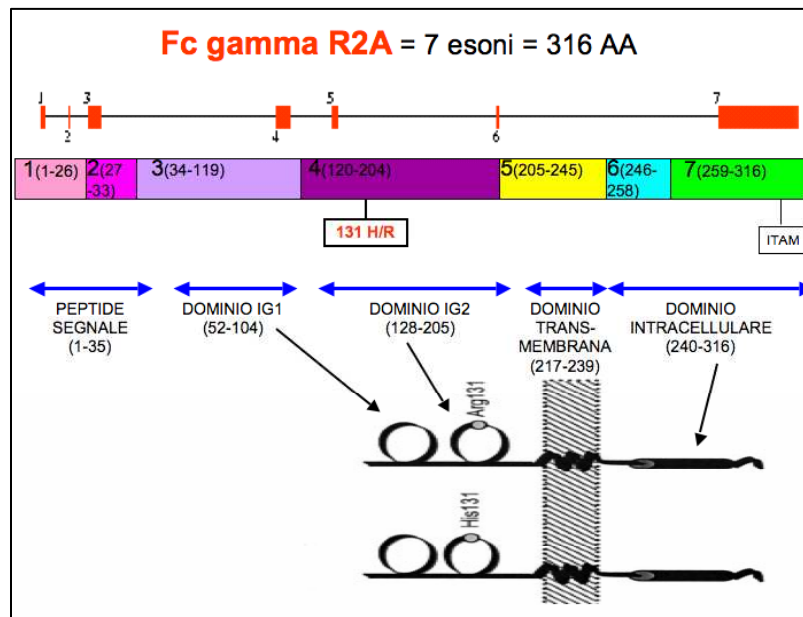


Figura 4: gene-RNA-proteina del recettore FcγRIIA.

Fin'ora è stato caratterizzato un solo polimorfismo del recettore FcγRIIA, all'interno del secondo dominio Ig like (fig 4), una sostituzione aminoacidica in posizione 131 da un'Istidina (H) a un'Arginina (R). Le frequenze alleliche di H e R sono circa uguali, R131 e H131 sono codominanti nella popolazione europea, le frequenze dei due genotipi omozigoti sono del 25% e dell'eterozigote H/R del 50% (Salmon et al 2001).

Il genotipo H/H viene generalmente considerato come "High-binding" per le IgG2; mentre R/R è "low-binding", perciò il genotipo H/H dovrebbe essere il più rappresentato in pazienti HIT e HITT (Karassa et al, 2004). Secondo un



lavoro di Pouplard del 1999, sembra che entrambi i genotipi H/H e R/R diano attivazione piastrinica (test SRA), anche se le piastrine R/R danno un rilascio di serotonina lievemente maggiore, inoltre non sembra esserci aumento di H/H nei pazienti HIT, ma di R/R nei pazienti con Trombosi. Infatti, secondo due lavori di Carlsson (Carlsson et al, 1998; Carlsson et al, 2003), eseguiti su un campione maggiore di pazienti con HIT e HITT, il genotipo H/H è aumentato in pazienti HIT, mentre R/R è overespresso nei pazienti HITT, dimostrando che le piastrine H/H vengono eliminate più velocemente, mentre le piastrine R/R rimangono in circolo più a lungo, protraendo lo stato protrombotico.

Secondo un lavoro di Brandt et al del 1995 il genotipo H/H sarebbe meno responsivo agli H-PF4 Ab mentre il genotipo R/R risponde bene in test in vitro con piastrine di donatori H/H e R/R e anticorpi HIT in presenza di eparina.

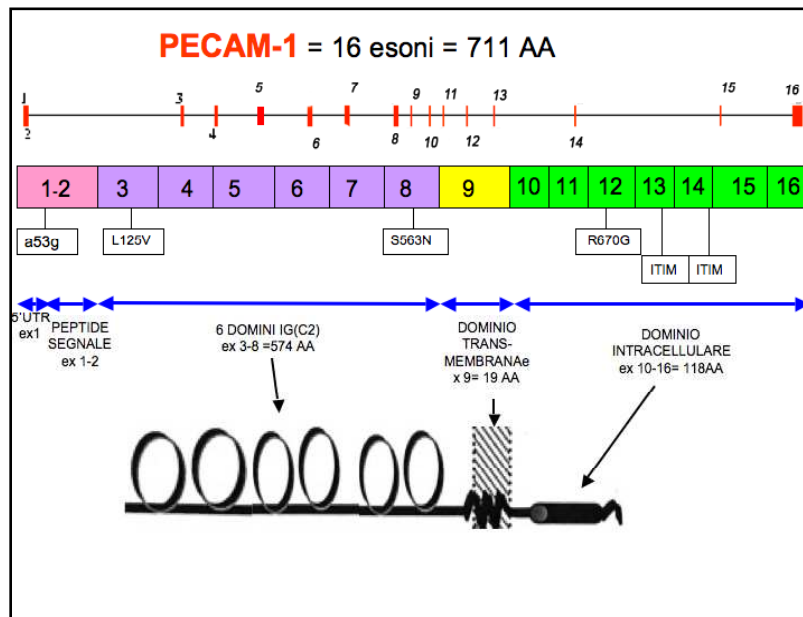
Vi sono numerose evidenze in letteratura che l'allele R 131 sia un fattore di rischio per la manifestazione di malattie mediate da complessi immuni, come il Lupus Eritematoso Sistemico (Rascu A et al, 1997). Tale ipotesi è supportata anche dal fatto che i pazienti R/R sono più sensibili alle infezioni batteriche rispetto agli individui H/H: la fagocitosi dei batteri opsonizzati con IgG2 è meno efficace nei pazienti con il genotipo R/R 131 (Sanders LAM et al, 1998).

Altri lavori non confermano tali ipotesi e dimostrano che non c'è differenza nella distribuzione genotipica o nella frequenza allelica tra pazienti HIT e HITT (Gruel Y, 2004; Arepally G et al, 1997).

### **PECAM-1**

PECAM-1 è una molecola di adesione tra endotelio e piastrine, descritta per la prima volta nella metà degli anni '80, è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline (possiede sei domini IgG-like), ed è espresso sulla superficie delle piastrine circolanti, dei monociti e dei neutrofili, nei sottogruppi di cellule T e sulle cellule endoteliali. Sono stati descritti vari polimorfismi di questa molecola, implicati sia nell'infarto al miocardio che nella malattia

coronarica. Il gene che codifica per PECAM 1 si trova nel cromosoma 17 e conta 16 esoni, per un totale di 711 aminoacidi (Fig.5); i primi due esoni codificano per il peptide segnale, sei esoni (3-8) codificano per i domini Ig like, l'esone 9 per la porzione transmembrana, e infine gli ultimi 7 esoni per la parte intracellulare.



**Figura 5: gene-RNA-proteina del recettore PECAM1.**

Nelle piastrine PECAM-1 funziona come regolatore bidirezionale sia di attivazione piastrinica che di trombosi: funge infatti da modulatore positivo dell'adesione piastrinica integrina mediata che aumenta la risposta secondaria all'aggregazione dell'ADP, sia da regolatore negativo. PECAM1 possiede infatti alcuni domini tirosin-chinasici inibitori (ITIM), che svolgono la loro funzione, una volta fosforilati, bloccando altri domini tirosin-chinasici attivatori, anch'essi fosforilati, che si trovino in proteine ad esso vicine (domini ITAM). La GPIb e FcγRIIA si trovano sulla membrana piastrinica vicini a PECAM, inoltre possiedono domini ITAM, e vengono perciò regolati negativamente da PECAM, inibendo la formazione di trombi arteriosi in vivo. (Kroll H et al, 2000; Rathore V et al 2003; Thai L et al, 2003). PECAM-1 quindi può regolare lo stimolo per la formazione del trombo e può determinare la dimensione e la

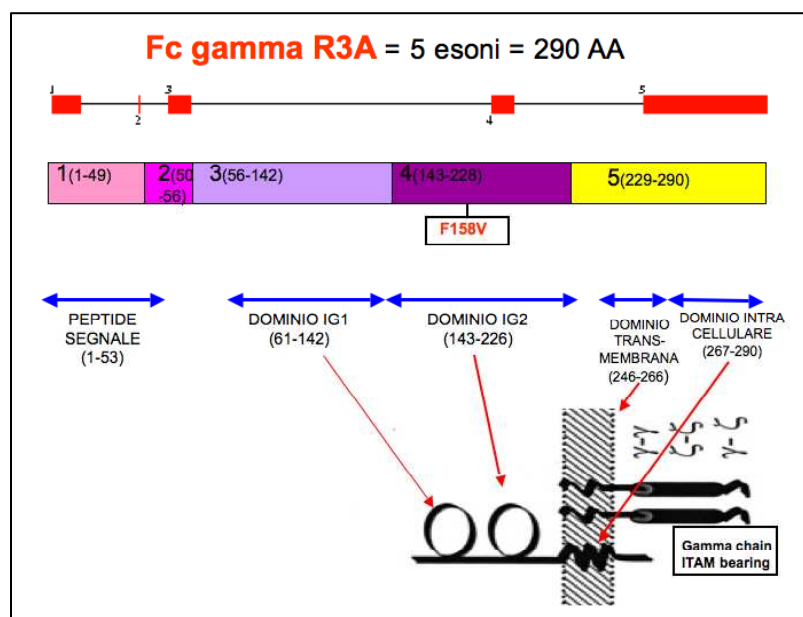
stabilità del trombo stesso. I tre polimorfismi in analisi, L125V (Laucina al posto di Valina), S563N (Serina al posto di Asparagina) e R670G (Arginina al posto di Glicina) sono in linkage disequilibrium, essi sono quindi ereditati come “blocco unico”; l’analisi è stata condotta su due di essi, i più lontani (L125V e R670G) tra i quali non è mai stato evidenziato cross over nella popolazione caucasica (Novinska M, 2006). I primi due polimorfismi si trovano nella regione extracellulare Ig like e il terzo nella regione intracellulare che media il segnale (Fig.5).

Il genotipo V/N/G (125-563-670) sembra alterare la migrazione transendoteliale dei monociti PECAM mediata aumentando il rischio di aterosclerosi, ed è quindi, in generale, associato a un tipo di evento cronico. Il genotipo L/S/R modula l’attivazione piastrinica e aumenta il rischio di infarto al miocardio, può essere quindi collegato ad eventi acuti (Elrayess M.A et al, 2004, 2005). Questi polimorfismi, studiati nell’ambito della malattia coronarica e in generale in patologie cardiache, non sono mai stati analizzati nella Trombocitopenia da Eparina. Secondo un lavoro di Grumet et al del 2001 le frequenze nella popolazione caucasica sono del 35% per il setting L/S/R (125-563-670), 48% per l’eterozigote e 17% per il setting V/N/G (125-563-670).

### **FcγRIIIA**

FcγRIIIA è il recettore per la porzione Fc delle immunoglobuline G, ed è coinvolto nella rimozione dei complessi antigene-anticorpo dal circolo e in altre risposte anticorpo-mediate. Il recettore FcγRIIIA è espresso sui macrofagi e sulle cellule Natural Killer (NK), ed è responsabile della clearance delle piastrine sensibilizzate con IgG. La molecola non contiene domini ITAM, ma trasduce il segnale utilizzando il dominio ITAM presente sulla “gamma chain” colocalizzata sulla membrana (Fig. 3). Il gene che codifica tale proteina si trova sul cromosoma 1 e conta cinque esoni, produce una proteina più piccola dei recettori precedentemente descritti, di 290 aminoacidi. Il primo esone è parte

del secondo codificano per il peptide segnale, mentre gli esoni 3 e 4 codificano per i due domini Ig like. Infine l'esone 5 codifica sia per la parte transmembrana che per il piccolo dominio intracellulare (Fig.6). Come già accennato, esso non possiede domini attivanti ITAM, ma trasduce il segnale grazie ai domini della "gamma Chain", situata in prossimità del recettore e che possiede una piccola parte transmembrana e la parte intracellulare ITAM bearing (Fig. 6). Il gene è molto simile ad un altro, collocato vicino nel cromosoma 1, FcγRIIIB, espresso nei neutrofili.



**Figura 6: gene-RNA-proteina del recettore FcγRIIIA.**

E' stato studiato un solo polimorfismo per questo recettore, una Fenilalanina al posto di una Valina, F158V. Secondo alcuni autori sarebbe proprio questo polimorfismo ad avere un ruolo nella patogenesi della Trombocitopenia da Eparina.

Esso si trova nel secondo dominio IgG-like, deputato al legame delle IgG. Il legame di FcγRIIIA F/F alle IgG è ridotto se confrontato con FcγRIIIA V/V. Questo polimorfismo funzionale induce un aumento di attività dei monociti e delle cellule NK nei donatori omozigoti V/V , perciò i macrofagi V/V sono più

efficaci nell'eliminare i complessi immuni (Gavasso S et al, 2005). In un lavoro del 2004 di Gruel infatti, comparando pazienti con anticorpi anti-eparina e pazienti HIT, la frequenza dell'omozigote V/V era significativamente più alta nei pazienti HIT. In quello studio inoltre gli omozigoti V/V erano più frequenti nei pazienti HIT che HITT, anche se in modo non significativo. Questo potrebbe confermare che la clearance delle piastrine è un meccanismo che causa trombocitopenia nella HIT, e che, eliminando le piastrine più efficacemente, i pazienti V/V sono "protetti" contro le trombosi. Secondo lo stesso lavoro di Gruel le frequenze nella popolazione caucasica sono del 35% per l'omozigote FF, 49% per l'eterozigote e 16% per l'omozigote V/V.

### GpIIIa

La glicoproteina IIIa (Gp IIIa o integrina  $\beta_3$ ), presente sulla superficie dei trombociti, è coinvolta insieme alla GpIIb nell'aggregazione piastrinica. Esse si complessano creando il recettore GpIIb/IIIa (Fig.3), che lega fibrinogeno, fattore di Von Willebrand, e altre proteine, riconoscendo in esse una sequenza RGD. Dopo l'attivazione porta le piastrine ad interagire e legarsi tra loro creando ponti con il fibrinogeno solubile, e portando così ad aggregazione.

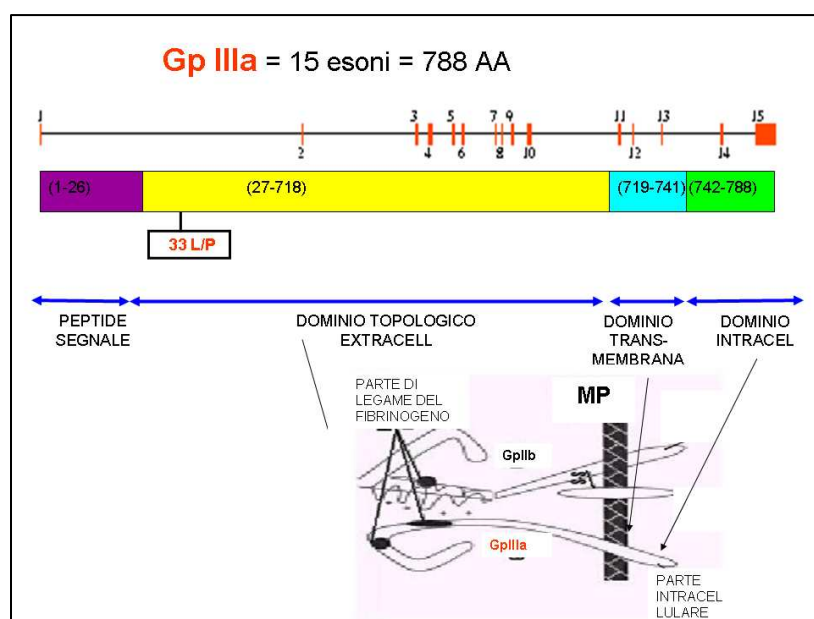


Figura 7: gene e proteina della Glicoproteina IIIa

Il gene che codifica per la Gp IIIa è nel cromosoma 17, conta 15 esoni per un totale di 788 aminoacidi. L'esone 1 codifica per il peptide segnale, vi è poi un dominio topologico extracellulare (AA 27-718), una parte transmembrana (AA 719-741), e un dominio intracellulare (AA 742-788).

All'interno del dominio extracellulare (nell'esone 2) è presente un polimorfismo in posizione 33, una Prolina al posto di una Leucina (L33P), chiamato anche PL A1/A2 o HPA1. Le piastrine dei soggetti che portano l'allele raro b (prolina 33), soprattutto in omozigosi, presentano una maggiore capacità di legame con il fibrinogeno e quindi una maggior aggregabilità. L'allele b è stato quindi associato ad un maggior rischio per infarto al miocardio, soprattutto in età giovanile; esso comporterebbe inoltre un aumentato rischio di restenosi coronaria dopo procedura di rivascularizzazione mediante impianto di stent (Weiss et al, 1996). Il polimorfismo HPA1 è anche principalmente coinvolto nel meccanismo patogenetico della trombocitopenia allo immune neonatale (NAIT). In caso di incompatibilità materno-fetale, già alla prima gravidanza si può osservare un passaggio di Ab alloimmuni dalla madre al feto con conseguente trombocitopenia (Carlsson, 2003).

Secondo un recente studio di Harris (Harris K et al, 2008), dato che l'allele b influenza l'aggregazione piastrinica, e dato che il meccanismo per cui avviene la trombosi nella HIT è mediato dall'attivazione piastrinica, l'HPA1 può influenzare il rischio trombotico in questa patologia. In questo studio infatti la presenza dell'allele b anche in eterozigosi è associata con un incremento dell'incidenza di trombosi, in particolare quelle arteriose.

## OBIETTIVO DELLA TESI

L'insorgenza della Trombocitopenia da Eparina (HIT) dipende da numerosi fattori. In alcuni pazienti la sieroconversione (presenza degli H-PF4 Ab) è asintomatica, mentre altri sviluppano una forma di trombocitopenia isolata (HIT), e solo alcuni di questi (il 20-40%) sviluppano complicanze tromboemboliche (HITT). L'ipotesi su cui si basa il presente studio è che il fenotipo clinico dei pazienti con anticorpi contro il complesso H/PF4 dipenda anche dal setting genetico del soggetto.

### **I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi:**

1. H-PF4 Ab = presenza anticorpi senza trombocitopenia
2. HIT = presenza di anticorpi con trombocitopenia
3. HITT = anticorpi + trombocitopenia + trombosi

**L'obiettivo del presente studio** è stato determinare se i polimorfismi genetici di alcuni recettori piastrinici e monocitari siano implicati nell'insorgenza della HIT o nelle complicanze trombotiche di questa patologia, a parità di presenza di anticorpi.

### **Fasi dello studio**

- Lo studio è iniziato con l'arruolamento e la selezione dei pazienti, sulla base della positività agli specifici test diagnostici. Si è studiato l'effetto patogenetico degli anticorpi, suddividendoli in attivanti (test HIPA positivo) e non attivanti (test HIPA negativo)
- Trattandosi di una patologia rara, per aumentare la casistica, abbiamo avviato una collaborazione con il Laboratorio di Immunologia e

Medicina Trasmfusionale del Professor Andreas Greinacher, a Greifswald, Germania, il centro Europeo più noto per lo studio e la diagnosi della HIT, che ci ha fornito alcuni pazienti. Mi sono inoltre recata nel laboratorio di Greifswald svolgere parte dello studio (test HIPA) durante l'ultimo anno di dottorato.

- Dopo aver determinato i tre gruppi di pazienti da analizzare, si è proceduto allo studio dei quattro polimorfismi in precedenza descritti, con metodiche di biologia molecolare.
- In seguito è stata condotta l'analisi statistica per determinare se esistono differenze significative nelle frequenze alleliche e genotipiche (per i quattro polimorfismi in modo indipendente) tra i tre gruppi di pazienti.
- Si è quindi cercato di individuare un setting polimorfico maggiormente associato alla patologia o alle complicazioni trombotiche correlate.



## PAZIENTI

Sono stati studiati circa trecento pazienti provenienti da diversi reparti degli Ospedali del Veneto, per i quali era sospettata la diagnosi di trombocitopenia indotta da eparina (HIT), in base allo score clinico delle "4T" (Lo GK et al, 2006). La diagnosi di HIT veniva confermata in presenza della positività sia al test ELISA (O.D.>1.0 Padova; >0.7 Greifswald) che al test funzionale HIPA; la diagnosi di HITT prevedeva, oltre la positività dei test, la conferma di un nuovo evento trombotico venoso o arterioso attraverso la valutazione clinico-funzionale-morfologica.

Sono stati inoltre studiati 75 pazienti con diagnosi di HIT e HITT arruolati in Germania, nel Dipartimento di Immunologia e Medicina Trasfusionale dell'Università di Greifswald, che rispettavano gli stessi criteri diagnostici (Prandoni P et al, 2005).

Sono stati quindi valutati in questo studio:

⇒ GRUPPO HIT: 50 pazienti

⇒ GRUPPO HITT: 53 pazienti

E' stato inoltre studiato un terzo gruppo di pazienti che presentavano anticorpi anti eparina/PF4 non funzionali: essi sono quindi rilevabili con il test ELISA (O.D.>1.0 Padova; >0.7 Greifswald), ma non con il test HIPA, non avendo la capacità di attivare le piastrine. Questi pazienti non presentano né piastrinopenia né altra sintomatologia di HIT. Il gruppo è formato da pazienti che hanno subito un intervento di cardiocirurgia in circolazione extracorporea, con trattamento con eparina non frazionata durante la fase extracorporea. La letteratura in questi casi riporta una sierconversione del 30%, mentre l'incidenza di HIT, come per la popolazione generale, è del 2% (Warkentin et al, 2003). Questi pazienti provengono da uno studio condotto con l'Unità di Cardiocirurgia dell'Ospedale di Padova (Centro Gallucci), e da un analogo

studio svolto dal Dipartimento di Medicina Trasfusionale in collaborazione con la Cardiocirurgia dell'Ospedale di Greifswald.

⇒ GRUPPO H/PF4/Ab: 51 pazienti

**Tabella 2: Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio.**

	M/F	Età (anni)	N° piastrine 10 <sup>9</sup> /L media ± 1 DS		4T score media ± 1 DS
Gruppo H/PF4/Ab (51 Pazienti)	31/20	69 ± 8	Basale: 214x10 <sup>9</sup> ± 63x10 <sup>9</sup>	Post intervento (8° gg): 308x10 <sup>9</sup> ± 96x10 <sup>9</sup>	1 ± 0,9
Gruppo HIT (50 Pazienti)	35/15	67 ± 9	Basale: 253x10 <sup>9</sup> ± 95x10 <sup>9</sup>	Nadir: 52x10 <sup>9</sup> ± 32x10 <sup>9</sup>	4,5 ± 0,8
Gruppo HITT (53 Pazienti)	34/19	65 ± 14	Basale: 240x10 <sup>9</sup> ± 61x10 <sup>9</sup>	Nadir: 35x10 <sup>9</sup> ± 20x10 <sup>9</sup>	6,7 ± 0,8

**Popolazione di controllo:**

Come popolazione di controllo per gli studi genetici (frequenza dei polimorfismi) è stato utilizzato un gruppo di 50 donatori di sangue, forniti dal centro Trasfusionale dell'ospedale di Padova. I donatori provengono dal nord Italia ed appartengono a diversi gruppi sanguigni. Le frequenze ottenute per i diversi polimorfismi sono state confrontate con quelle fornite dalla letteratura per la popolazione caucasica.

## MATERIALI E METODI

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

I campioni di sangue venoso periferico sono stati raccolti dai pazienti e da volontari sani dopo consenso informato. Il sangue è stato raccolto in Na Citrato 3,8%, 1:9 v/v, per ottenere il plasma, o in Citratato Acido-Destrosio (ACD) 1,5 : 8,5 v/v per ottenere il PRP. Per ottenere il siero il sangue è stato raccolto direttamente in provetta di vetro. Per l'ottenimento del PRP, il sangue è stato centrifugato a 180 x g per 15 minuti a temperatura ambiente; per il siero e il PPP invece, le provette sono state centrifugate a 1050 x g per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette pulite adeguate all'analisi nel caso del plasma e del siero, o alle successive fasi di preparazione del campione nel caso del PRP.

### A) Test ELISA: Ricerca degli anticorpi anti Eparina/PF4 (H/PF4/Ab)

Come test immunologico per determinare la presenza dei complessi H/PF4/Ab nel plasma in esame nel nostro laboratorio è stato scelto il test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) della ditta GTI (GTI, Waukesha, USA), seguendo le indicazioni del produttore. Il plasma da testare veniva posto nei pozzetti di una micropiastra, coattati con un complesso PF4-PVS (Polivinil-solfato, analogo dell'Eparina). Se gli anticorpi erano presenti nel plasma, si legavano alla piastra e venivano riconosciuti da specifici anticorpi secondari legati a fosfatasi alcalina, forniti col kit, in grado di riconoscere la porzione Fc di classe IgG. In seguito all'aggiunta di un substrato cromogenico (PNPP p-nitrofenil fosfato), la reazione veniva bloccata con idrossido di sodio. Veniva poi misurata spettrofotometricamente (405 nm) la densità ottica (O.D.), essa è proporzionale

alla quantità di anticorpi presenti nel campione. Sono stati considerati positivi i campioni con O.D. > 1.0 (Warkentin TE, 2008).

I campioni provenienti dall'Università di Greifswald sono stati testati in loco con metodo ELISA "in House" (Juhl D et al, 2006) che ha mostrato una buona correlazione con il test GTI da noi utilizzato. La lettura spettrofotometrica veniva effettuata a 450 nm, il cut off di positività per le IgG era O.D. > 0,7.

### **B) Test funzionale: Attivazione delle piastrine da Eparina (HIPA)**

Il test funzionale HIPA determina la capacità del siero in esame di far aggregare le piastrine lavate di quattro diversi donatori in un sistema di agitazione, in presenza di Eparina a diverse concentrazioni. Il test è stato messo a punto ed eseguito su tutti i campioni presso l'Università di Greifswald, laboratorio di Immunologia, dove mi sono recata durante l'ultimo anno di dottorato (Greinacher A et al, 1991).

#### Preparazione delle piastrine

Al fine di ottenere le piastrine lavate per il test è stato necessario procedere ad una serie di lavaggi partendo dal PRP dei donatori.

1. PRP + 111µl di ACD-A + 5 µl di Apirasi (Sigma Aldrich St. Louis MO USA) per ogni ml di PRP.
2. Centrifugazione (7 min 750 x g)
3. Eliminazione del surnatante e risospensione delle piastrine in 5 ml di washing buffer (10ml tyrode buffer, 25U apirasi, 10U irudina, a pH6.3)
4. Incubazione delle piastrine per 15 min a 37°C
5. Centrifugazione (7 min 750 x g)
6. Eliminazione del surnatante e risospensione delle piastrine in 1 ml di washing buffer II (50ml tyrode buffer contiene 0.212M MgCl<sub>2</sub> e 0.196M CaCl<sub>2</sub>, a pH 7.2)
7. Conta delle piastrine e diluizione con washing buffer II a 300000 plts/µl
8. Tenere le piastrine almeno 45 min a 37°C prima dell'uso.

### Esecuzione del test

Nei pozzetti di una micropiastra (U-Shaped plate Greiner BIO-ONE, Germania) venivano aggiunti i seguenti componenti:

- 20 µl di siero del paziente inattivato (56°C per 30 minuti) in tutti i pozzetti
- HMWH-Eparina alto peso molecolare dove necessario (1000U/µl, 10µl)
- Washing buffer II dove necessario (10 µl)
- 75 µl di piastrine lavate in tutti i pozzetti
- LMWH-Eparina basso peso molecolare dove necessario (20U/µl, 10 µl)

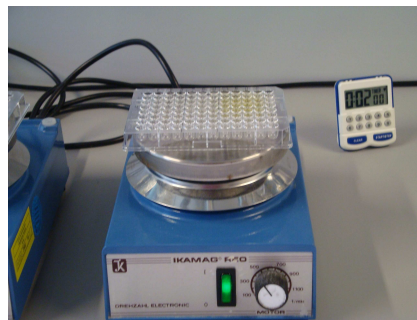
Venivano inseriti per ogni piastra un controllo positivo e un controllo negativo testati con tutti e quattro i donatori, oltre a un controllo positivo dell'attivazione piastrinica da collagene (1µg/ml f.c. Nicomed, Austria).

Per ogni paziente era necessario utilizzare tre pozzetti per le 3 concentrazioni di eparina (0-0,2-100U/mL) per ogni donatore (tot 12 pozzetti per ogni paziente).

**Tabella 3: Schema di lavoro sulla micropiastra**

	Wash Buffer II	Eparina LMWH =0.2 U/ml Irudina =50 U/ml	Eparina HMWH =100 U/ml	Collagene =1 µg/ml	Siero inattivato del paziente	Sospensione piastrine (300 x10 <sup>9</sup> /L)
Controllo con buffer (controllo negativo)	10 µl				20 µl	75 µl
Bassa conc di Eparina, positivo nel caso di HIT		10 µl			20 µl	75 µl
Alta conc di Eparina, negativo nei casi di HIT			10 µl		20 µl	75 µl
Verifica della funzione piastrinica (controllo positivo con collagene)	20 µl			10 µl		75 µl

La piastra veniva incubata su un agitatore magnetico (1000 rpm, agitatore Ikamag REO) per 45 minuti (Fig 8), a temperatura ambiente, con due microsfere di acciaio in ogni pozzetto (1.5 mm diametro). La trasparenza della soluzione veniva controllata ogni cinque minuti usando una fonte di luce indiretta. Sono stati considerati positivi i pazienti in cui era evidente la presenza di aggregati piastrinici sul fondo del pozzetto con almeno 3 donatori su 4, ma solamente con la concentrazione terapeutica di Eparina (0,2 U/ml) (Eichler P et al, 1999).



**Figura 8: Incubazione su agitatore magnetico - HIPA test**

### Studio dei polimorfismi genetici

#### *Estrazione del DNA genomico*

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero, fresco o congelato, utilizzando una metodica semiautomatica mediante l'estrattore di acidi nucleici "MAXWELL 16 instrument" della ditta Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA). L'estrazione (16 campioni per volta) è stata eseguita seguendo la metodica ed i reagenti (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit) forniti per l'uso dello strumento dal produttore.

Per i pazienti dello studio tedesco l'estrazione del DNA è stata eseguita in loco con un kit di estrazione (DNA isolation Kit for Mammalian Blood) della ditta Roche (Roche-applied-science, Mannheim, Germany) secondo la metodica del produttore.

Per l'analisi di tutti i polimorfismi sono state usate tecniche di PCR allele specifica. In tutti i casi tale metodica è stata validata tramite sequenziamento automatico del DNA.

### 1) Polimorfismo H131R di *FcγRIIA*

Il gene che codifica *FcγRIIA* presenta un polimorfismo, denominato H131R, che comporta il cambiamento di una singola base (A>G) e determina l'inserimento di una Istidina al posto di una Arginina in posizione 131 della proteina matura. Per l'analisi di questo polimorfismo è stata messa a punto una PCR (reazione a catena della polimerasi) **allele specifica**, in cui si procede all'amplificazione del frammento di DNA contenente la variazione in esame utilizzando separatamente (in due mix diverse) due primer specifici per la base che caratterizza il polimorfismo (i due primer differiscono per una sola base). L'analisi è stata effettuata tramite gel di agarosio 2%, con l'uso di Etidio Bromuro come colorante (40 min a 80 V); nel gel si valuta quale dei due primer si è legato al DNA e quindi quale base sia presente. E' sempre stato utilizzato anche un set di primer di controllo per l'amplificazione; sono stati inoltre inseriti nella PCR, oltre a un controllo negativo, tre controlli positivi (H/H; H/R; R/R) precedentemente testati con sequenziamento automatico.

#### Condizioni PCR

Componenti	Conc. Iniziale	Volumi (µl)	Conc. Finale
buffer	10 X	1,25	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,25	200 µM
primer Pc3'	10 µM	0,0875	0,07 µM
primer Pc5'	10 µM	0,0875	0,07 µM
primer R/H 131 For	10 µM	0,625	0,5 µM
primer 131 Rev	10 µM	0,625	0,5 µM
taq GOLD (Applied Biosystem, Foster City,USA)	5 u/µl	0,18	1U totale
DNA	10-15 ng/µl	2	20-30 ng totali
H <sub>2</sub> O		6,625	fino a 12,5 µl

## Programma PCR

<b>1 Hold</b>	<b>3 T° x 15 cicli</b>			<b>3 T° x 20 cicli</b>			<b>2 Hold</b>	
95°C	95°C	T° A: 57°C	72°C	95°C	T° A: 54°C	72°C	72°C	4°C
15 min	1 min	2 min	1 min	1 min	2 min	1 min	5 min	

Sequenza primer, da Gulen F et al, 2007 (ditta Sigma Aldrich St. Louis MO USA)

H131FOR ATCCCAGAAATTCTCCCA

R131FOR ATCCCAGAAATTCTCCCG

REV131 CAATTTTGCTGCTATGGGC

pC3' TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC

pC5' GCCTTCCCAACCATCCCTTA

### **2) Polimorfismo L125V di PECAM 1**

Il gene che codifica la molecola di adesione PECAM1 presenta diversi polimorfismi, tre dei quali vengono ereditati come blocco unico, come già descritto in precedenza (L125V, S563N, R670G). Il polimorfismo L125V, che è stato analizzato in tutti i pazienti, consiste nel cambiamento di una singola base (C>G), e determina l'inserimento di una Leucina al posto di una Valina in posizione 125 della proteina matura.

Anche per l'analisi di questo polimorfismo è stata utilizzata una **PCR allele specifica**. Come setting di primer di controllo è stato utilizzato lo stesso primer For della banda specifica, ma un primer Rev più a valle nel gene rispetto al polimorfismo in esame.

L'analisi è stata eseguita tramite gel di agarosio 2%, con l'uso di Etidio Bromuro come colorante (40 min a 80 V). In tutte le reazioni di PCR sono stati inseriti anche in questo caso, oltre a un controllo negativo, tre controlli positivi (L/L;V/V;V/L) precedentemente testati con sequenziamento automatico.



### Condizioni PCR

Componenti	Conc. Iniziale	Volumi (µl)	Conc. Finale
PCR Green Master Mix (Promega Corp. Madison, WI, USA)	2 X	6,25	1 X
primer For	10 µM	1	0,8 µM
primer L/V125 Rev	10 µM	0,5	0,4 µM
primer Rev controllo	10 µM	0,5	0,4 µM
DNA	20 ng/µl	2	40ng totali
H <sub>2</sub> O		2,25	fino a 12,5 µl

### Programma PCR

1 Hold	3 T° x 40 cicli			2 Hold	
95°C	95°C	60°C	74°C	74°C	4°C
3 min	40 sec	40 sec	40 sec	5 min	

Sequenza primer, da Kroll et al, Blood 2000 (ditta Sigma Aldrich St. Louis MO USA)

PECAM1 FOR CTGCCTTCCTTCGGGTTGCA

PECAM1 REV TATTCACGCCACTGTGTGCT

L125REV CAAGGACTCACCTTCCACCAACAG

V125REV CAAGGACTCACCTTCCACCAACAC

### **3) Polimorfismo R670G di PECAM 1**

Per circa la metà dei pazienti è stata inoltre eseguita l'indagine sul polimorfismo R670G, terzo del blocco in linkage disequilibrium, per conferma che l'allele R670 si trovasse sempre in collegamento all'allele L125 (lo stesso per l'allele G670 e V125). Tale analisi è stata effettuata con **sequenziamento automatico del DNA**.

I frammenti amplificati con PCR sono stati purificati dai primers presenti dopo digestione enzimatica con ExoSap (GE Healthcare,UK) per 15 min a 37°C seguiti da inattivazione dell'enzima ad 80°C per altri 15 min. Dopo tale trattamento, i frammenti sono stati sequenziali con il metodo diretto usando i reagenti Big Dye Terminator Cycling Method (Applied Biosystem, Foster City, CA; USA) secondo le indicazioni del produttore. Per le diverse reazioni sono state usate 1,5 pmol di primer.

### Condizioni PCR

<b>Componenti</b>	<b>Conc. Iniziale</b>	<b>Volumi (µl)</b>	<b>Conc. Finale</b>
PCR Master Mix (Promega Corp. Madison, WI, USA)	2 X	6,25	1 X
Primer For	10 µM	0,5	0,8 µM
Primer Rev	10 µM	0,5	0,4 µM
DNA	20 ng/µl	2	40ng totali
H <sub>2</sub> O		3,25	fino a 12,5 µl

Il programma per la PCR è lo stesso del precedente polimorfismo, consigliato dalla ditta Promega, fornitore delle mix per la reazione. La temperatura di annealing è anche in questo caso di 60°C.

### Sequenziamento: prima fase

<b>Componenti</b>	<b>Volumi (µl)</b>
prodotto PCR	1
Exosap-it	1,4
H <sub>2</sub> O	1,6

### Programma EXOSAP

1 Hold	1 Hold
37°	80°
15 min	15 min

### Sequenziamento:seconda fase

(aggiungere ai 4 µl già preparati)

<b>Componenti</b>	<b>Volumi (µl)</b>
Big-Dye	3
primer (5 µM)	1
buffer	2
<b>TOT 10 µl</b>	

Sequenza primer (ditta Sigma Aldrich St. Louis MO USA): I primers sono stati disegnati utilizzando il programma disponibile on line "Primer 3"

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)

PECAMex12FOR TTCCCTTGTCACCTACCCTAA

PECAMex12REV GGCTGGGTACAGGGTCATTA

#### 4) Polimorfismo V158F di FcγRIIIA

Anche in questo caso è stata usata una **PCR allele specifica**, e anche qui come setting di primer di controllo è stato utilizzato lo stesso primer For della banda specifica, ma un primer Rev più a valle nel gene rispetto al polimorfismo in esame. L'analisi come negli altri casi è stata eseguita tramite gel di agarosio 2%, (40 min a 80 V). In tutte le reazioni di PCR sono stati inseriti anche in questo caso, oltre a un controllo negativo, tre controlli positivi (V/V;V/F;F/F) precedentemente testati con sequenziamento automatico. Il polimorfismo V158F consiste nel cambiamento di una singola base (G>T), e determina l'inserimento di una Valina al posto di una Fenilalanina in posizione 158 della proteina matura.

#### Condizioni PCR

Componenti	Conc. Iniziale	Volumi (µl)	Conc. Finale
PCR Green Master Mix (Promega Corp. Madison, WI, USA)	2 X	6,25	1 X
DMSO(solo nella mix V158)	50%	1	4%
primer For	10 µM	1	0,8 µM
primer V158Rev	10 µM	0,3	0,3 µM
primer F158Rev	10 µM	0,5	0,4 µM
primer Rev controllo	10 µM	0,5	0,4 µM
DNA	20 ng/µl	2	40ng totali
H <sub>2</sub> O		1,45 mix V 2,25 mix F	fino a 12,5 µl

#### Programma PCR

1 Hold	3 T° x 35 cicli			2 Hold
95°C	95°C	60°C	74°C	74°C
3 min	40 sec	30 sec	30 sec	5 min
				4°C

Sequenza primer, da Gavasso et al, Atheroscl 2005 (ditta Sigma Aldrich St. Louis MO USA)

Fc3 FOR TAAAAGCCCACTCAAAGAC

Fc3 REV TCCCAACTCAACTTCCCAGT

Fc3 V158REV CTGAAGACACATTTTTACTCCCAAC

Fc3 F158REV CTGAAGACACATTTTTACTCCCAAA

Il primer For è stato disegnato in modo da annilare in corrispondenza di alcune basi particolari che risultano diverse tra il gene FcγRIIIA e RIIIB, in modo da legarsi ed amplificare solamente il frammento di interesse.

#### 5) Polimorfismo L33P di GpIIIa (HPA1)

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

#### Condizioni PCR

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

### Programma PCR Real Time

Fase 1: Absolute Quantification

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

Fase 2: Discriminazione allelica post amplificazione

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

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

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

PRIMER FOR TCTCTTTGGGCTCCTGTCTTACA

PRIMER REV GCAGATTCTCCTTCAGGTCACA

### Analisi statistica

L'analisi statistica delle frequenze dei diversi genotipi e alleli è stata condotta con l'uso del software SPSS 16.0 Si è proceduto ad un'analisi in due step: il primo test utilizzato è stato il  $\chi^2$  (chi-quadrato) per lo studio dell'associazione tra la frequenza di un genotipo o un allele e il gruppo di pazienti, considerando ogni polimorfismo separato dagli altri. E' stata in seguito condotta un'analisi multivariata (Multivariate regression analysis) per il confronto multiplo dei diversi genotipi risultati significativi con il test del  $\chi^2$ . Lo scopo è stato quello di determinare se esiste un'associazione tra gruppi di pazienti e setting polimorfico, al fine di individuare un insieme di variazioni genetiche maggiormente associato al gruppo HIT o al gruppo con Trombosi (HITT). La soglia di significatività statistica utilizzata era  $p < 0,05$ .



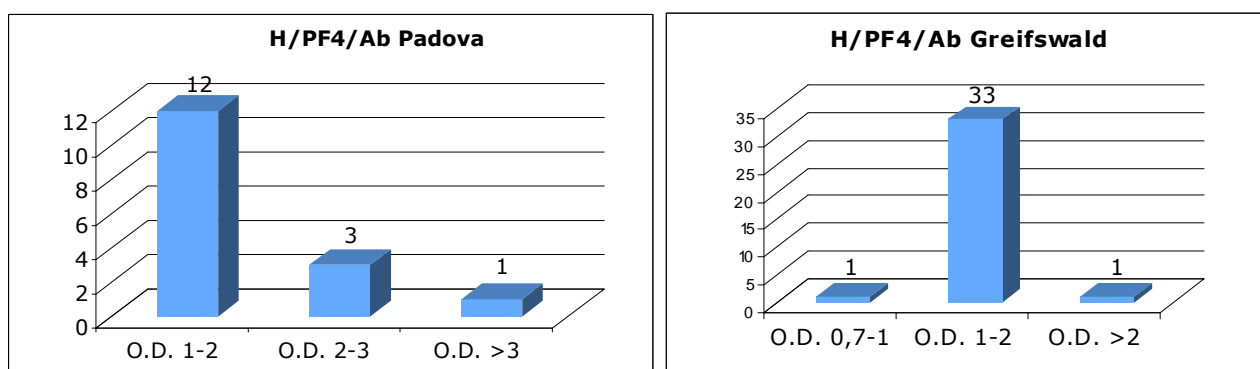
## RISULTATI

### RICERCA ANTICORPI ANTI EPARINA/PF4: test ELISA e test HIPA

**Gruppo H/PF4/Ab** (pazienti cardiocirurgici): **16 pazienti Padova + 35 pazienti Greifswald.**

Per tutti i pazienti, il test ELISA è risultato positivo, il gruppo più rappresentato è quello con valori di O.D. tra 1 e 2 (sia per ELISA GTI che per ELISA “in House”) (13 pazienti PD e 33 pazienti Greifswald) (Fig.9).

*Tutti questi pazienti sono risultati NEGATIVI al test funzionale HIPA: gli anticorpi rilevati dal test ELISA non sono funzionalmente attivi.*

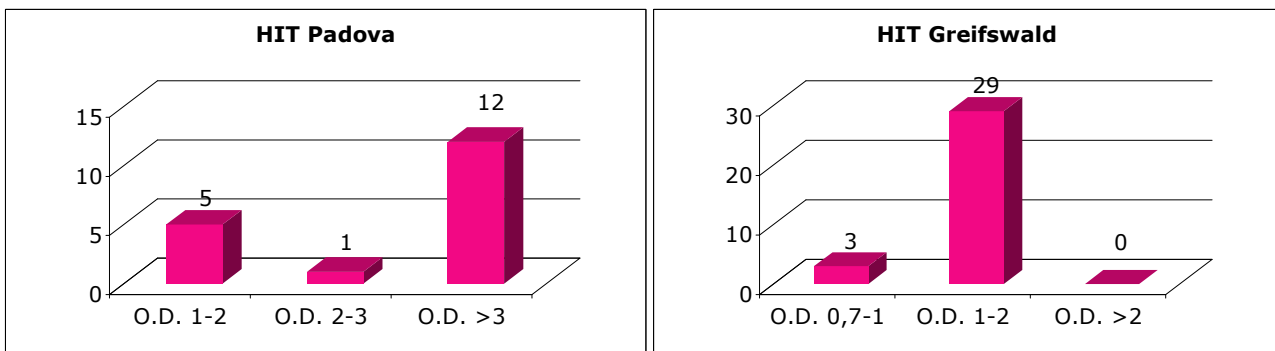


**Figura 9:** Valori di densità ottica rilevati sul plasma dei pazienti H/PF4/ Ab con test ELISA

**Gruppo HIT:** 18 pazienti Padova + 32 pazienti Greifswald

Anche in questo caso tutti i pazienti hanno test ELISA positivo. La maggior parte dei pazienti testati con ELISA “in House” eseguito in Germania hanno una O.D. tra 1 e 2, come nel caso dei pazienti H/PF4/ Ab (29 pazienti), mentre per quelli testati con ELISA GTI l’O.D. più rappresentata è per valori più alti, oltre 3 (12 pazienti), mentre solo 5 pazienti hanno valori tra 1 e 2 (Fig.10).

*Tutti questi pazienti sono risultati POSITIVI al test funzionale HIPA: gli anticorpi rilevati dal test ELISA sono funzionalmente attivi e in grado di far aggregare le piastrine nella piastra.*

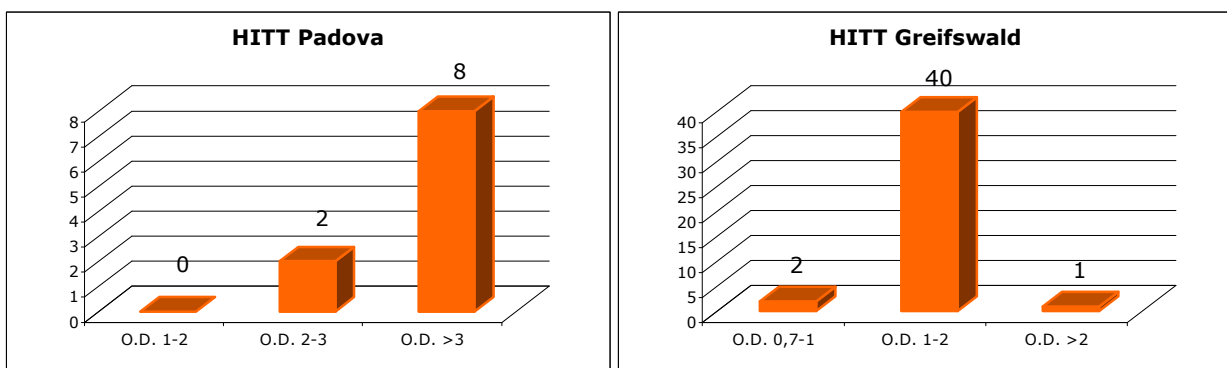


**Figura 10:** Valori di densità ottica rilevati sul plasma dei pazienti HIT con test ELISA.

**Gruppo HITT: 10 pazienti Padova + 43 pazienti Greifswald**

Tutti i pazienti hanno anticorpi rilevabili dal test ELISA. Nel caso del test eseguito in Germania ("in House), la maggior parte dei pazienti ha una O.D. tra 1 e 2 come per gli altri gruppi (40 pazienti); mentre per il test GTI 8 pazienti su 10 hanno un valore di O.D. maggiore di 3 (Fig. 11).

*Tutti questi pazienti sono risultati POSITIVI al test funzionale HIPA: gli anticorpi rilevati dal test ELISA sono funzionalmente attivi e in grado di far aggregare le piastrine.*

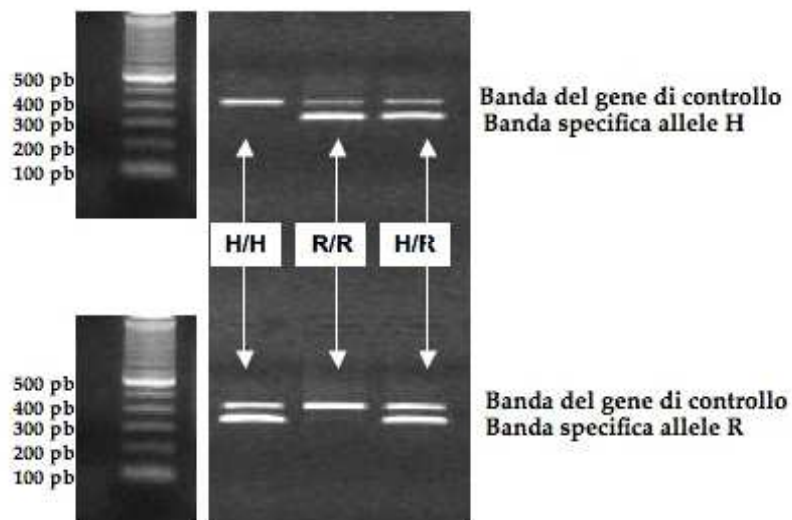


**Figura 11:** Valori di densità ottica rilevati sul plasma dei pazienti HITT con test ELISA



## STUDIO GENETICO

Il gene *FCGR1IA* presenta un polimorfismo, H131R, che è stato analizzato con PCR allele specifica. In ogni reazione sono stati inseriti tre controlli, un donatore H/H, uno R/R e uno H/R, tipizzati tramite sequenziamento del DNA. L'interpretazione dei risultati è stata eseguita confrontando le bande di controllo e specifiche dei pazienti con quelle dei controlli (Fig. 12).

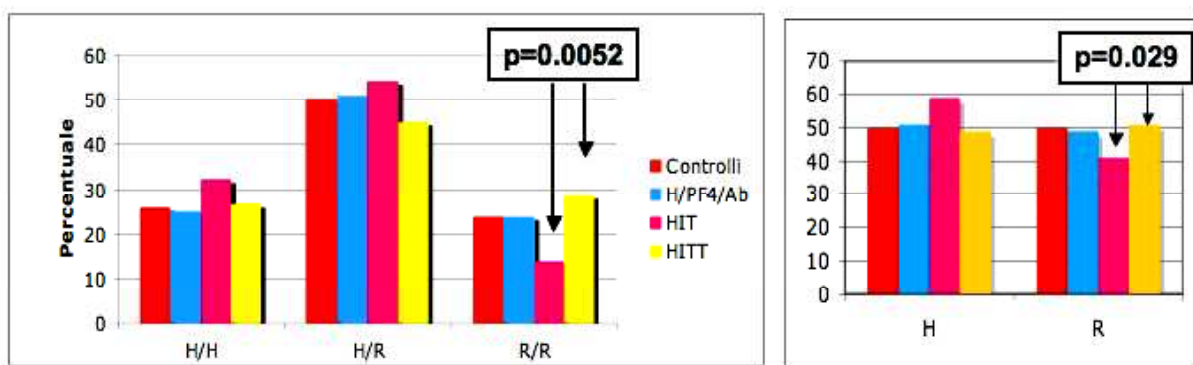


**Figura 12: PCR allele specifica per H131R:** Fotografia agli UV del gel di agarosio 2% marcato con Etidio Bromuro. Il primo gruppo di bande determina la presenza o meno dell'allele H nel campione, la banda più in alto, sempre presente, è la banda di controllo dell'avvenuta amplificazione. Il secondo gruppo di bande determina invece la presenza nel campione dell'allele R, e, anche in questo caso, la banda più alta, sempre presente, è quella di controllo. Dal confronto con il marker di peso molecolare è possibile avere una stima della grandezza dei frammenti in analisi.

**Tabella 4: Frequenze rilevate nei campioni analizzati per H131R del gene *FCGR1IA*:**  
 Al lato del nome del gruppo è indicato, tra parentesi, il numero di soggetti per ogni gruppo. In tabella le frequenze percentuali sono indicate tra parentesi, mentre il numero di soggetti per ogni genotipo è indicato fuori parentesi.

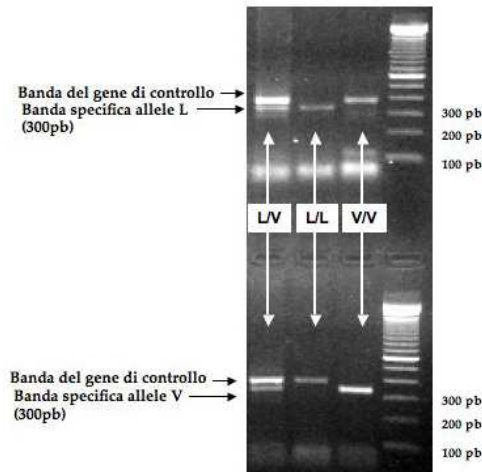
	H/H	H/R	R/R	H	R
<b>H/PF4/Ab(51)</b>	13(25%)	26(51%)	12(24%)	51%	49%
<b>HIT(50)</b>	16(32%)	27(54%)	7(14%)	59%	41%
<b>HITT (53)</b>	14(26.5%)	24(45%)	15(28.5%)	49%	51%
<b>Controlli letteratura</b> (JE Salmon, 2001)	25%	50%	25%	50%	50%
<b>Controlli Padova(50)</b>	26%	50%	24%	51%	49%

Come si può osservare dai valori tabulati (Tabella 4), nel gruppo HITT la frequenza del genotipo R/R è aumentata rispetto al gruppo HIT. Le frequenze dei polimorfismi osservate per i controlli rispecchiano la letteratura. Dopo aver verificato che il polimorfismo fosse in equilibrio di Hardy-Weinberg, si è proceduto all'analisi statistica. Utilizzando il test del  $\chi^2$  per il confronto dei dati osservati con gli attesi, ne risulta che tale differenza è statisticamente significativa ( $p=0.0052$ ). Lo stesso test è stato utilizzato per l'analisi delle frequenze alleliche, determinando che la frequenza dell'allele R nelle HITT è aumentata ( $p=0.029$ ) in modo significativo rispetto alle HIT (nelle HIT è aumentata la frequenza dell'allele H) (Fig. 13).

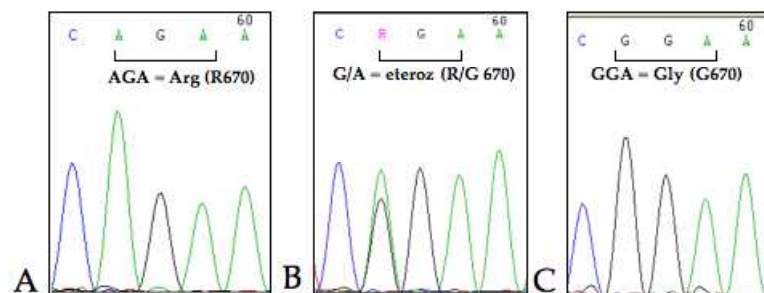


**Figura 13:** Istogrammi relativi alle frequenze (%) di genotipi e alleli per il polimorfismo H131R del gene *FCGR1IA*

Il gene *PECAM-1* presenta tre polimorfismi in linkage disequilibrium, il polimorfismo L125V è stato analizzato in tutti i pazienti con PCR allele specifica, confrontando le bande dei pazienti con quelle dei donatori di controllo L/L, L/V e V/V (Fig.14). Il polimorfismo R670G è stato analizzato con sequenziamento automatico del DNA in circa metà pazienti confermando che l'allele R670 è sempre in associazione con l'allele L125 (Fig.15).



**Figura 14: PCR allele specifica per L125V del gene *PECAM 1*** Fotografia agli UV del gel di agarosio 2% marcato con Etidio Bromuro. Il primo gruppo di bande determina la presenza o meno dell'allele L nel campione, la banda più in alto funge da controllo dell'avvenuta amplificazione. Il secondo gruppo di bande determina invece la presenza nel campione dell'allele V, e, anche in questo caso, la banda più alta, è quella di controllo. Nei casi di omozigosi non è visibile la banda di controllo ma solamente la banda specifica.



**Figura15: Sequenziamento dell'esone 13 del gene *PECAM1*.**

Pannello A) paziente omozigote per Arginina: è visibile la parte di sequenza relativa al codone che codifica l'Arginina 670 (AGA), la base A è presente in omozigosi.

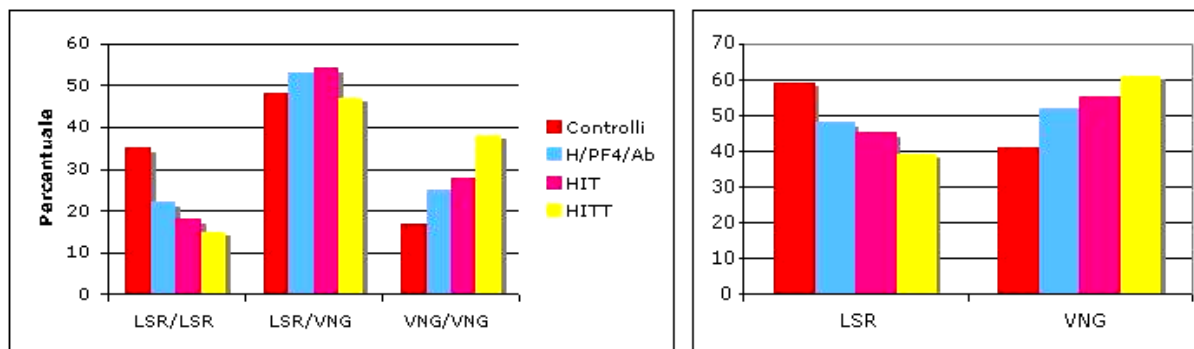
Pannello B) paziente eterozigote Arginina/Glicina: è presente la sequenza eterozigote per i due alleli, con sovrapposizione della base A (in verde) e G (in nero).

Pannello C) paziente omozigote per Glicina: è visibile la presenza della sola base G, il codone GGA codifica per la Glicina 670.

**Tabella 5: Frequenze rilevate nei campioni analizzati per L125V (associato a S563N e R670G) di PECAM-1.** Al lato del nome del gruppo è indicato, tra parentesi, il numero di soggetti per ogni gruppo. In tabella le frequenze percentuali sono indicate tra parentesi, mentre il numero di soggetti per ogni genotipo è indicato fuori parentesi.

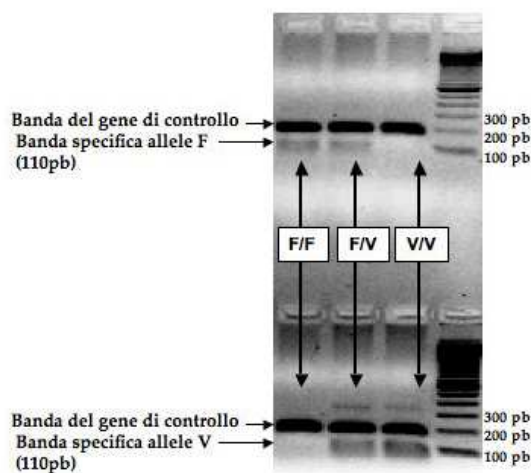
	<b>L/L</b>	<b>L/V</b>	<b>V/V</b>	<b>L</b>	<b>V</b>
<b>H/PF4/Ab(51)</b>	11(22%)	27(53%)	13(25%)	48%	52%
<b>HIT(50)</b>	9(18%)	27(54%)	14(28%)	45%	55%
<b>HITT(53)</b>	8(15%)	27(47%)	20(38%)	40%	60%
<b>Controlli letteratura</b> (Grumet et al,2001)	35%	48%	17%	59%	41%
<b>Controlli Padova(50)</b>	33%	49%	20%	57%	43%

Le frequenze dei polimorfismi osservate per i controlli si discostano poco (in modo non significativo) dalla letteratura (Tab.5). Nei gruppi HIT e HITT la frequenza del genotipo V/V (e quindi del setting polimorfico VNG) in omozigosi risulta aumentata rispetto alle frequenze del gruppo H/PF4/Ab, in modo lieve per il gruppo HIT e più marcato per il gruppo HITT. Tale frequenza risulta aumentata anche rispetto ai controlli sani riportati dalla letteratura (Grumet et al, 2001). L'analisi statistica è stata eseguita dopo aver verificato che il polimorfismo seguisse l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Analizzando la differenza tra i dati osservati e gli attesi tra i gruppi H/PF4/Ab e HIT e tra HIT e HITT con il test del  $\chi^2$ , si ottiene una p non considerata statisticamente significativa. La frequenza dell'allele V125 nel gruppo HIT è aumentata rispetto alla frequenza dello stesso allele nel gruppo degli H/PF4/Ab, lo stesso aumento dell'allele V è evidente anche nel gruppo HITT rispetto al gruppo HIT, ma tale aumento non risulta statisticamente significativo (Tab. 5). Esiste comunque una tendenza, nel gruppo che sviluppa trombocitopenia, e ancor di più nel gruppo con complicanze trombotiche, ad un aumento dell'allele V e quindi del setting polimorfico VNG (Fig. 16).



**Figura 16:** Istogrammi relativi alle frequenze (%) di genotipi e alleli per il setting di polimorfismi in linkage disequilibrium del gene *PECAM1*, LSR (L125,S563,R670), e VNG (V125,N563,G670)

Il gene *FCGR3IA* presenta un polimorfismo, F158V, anch'esso analizzato con PCR allele specifica. Come per gli altri polimorfismi, il metodo è stato validato tramite sequenziamento; il genotipo per ogni paziente è stato determinato dal confronto nel gel di agarosio delle bande dei campioni con le bande dei controlli (Fig. 17). I risultati sono riportati in Tabella 6.

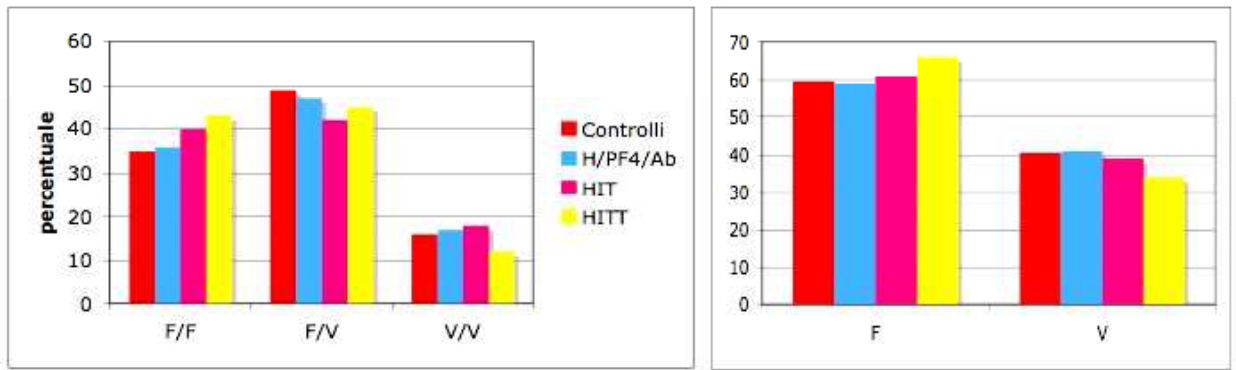


**Figura 17: PCR allele specifica per F158V del gene *FCGR3IA*.** Fotografia agli UV del gel di agarosio 2% marcato con Etidio Bromuro. Il primo gruppo di bande determina la presenza o meno dell'allele F nel campione, la banda più in alto, sempre presente, è la banda di controllo dell'avvenuta amplificazione. Il secondo gruppo di bande determina invece la presenza nel campione dell'allele V, e, anche in questo caso, la banda più alta, è quella di controllo. Dal confronto con il marker di peso molecolare è possibile avere una stima della grandezza dei frammenti in analisi.

**Tabella 6: Frequenze rilevate nei campioni analizzati per il polimorfismo F158V del gene FCGR3A.** Al lato del nome del gruppo è indicato, tra parentesi, il numero di soggetti per ogni gruppo. In tabella le frequenze percentuali sono indicate tra parentesi, mentre il numero di soggetti per ogni genotipo è indicato fuori parentesi.

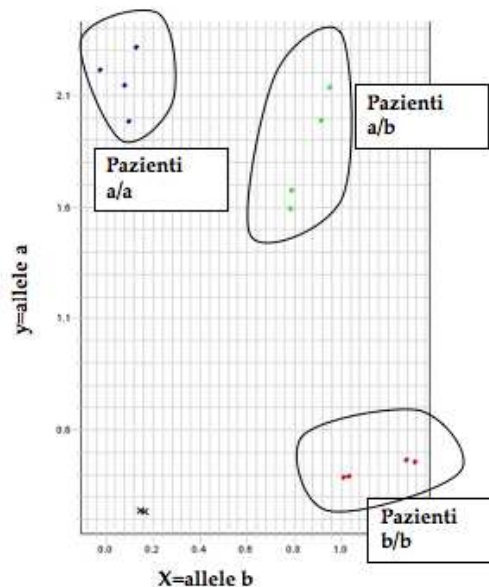
	<b>F/F</b>	<b>V/F</b>	<b>V/V</b>	<b>F</b>	<b>V</b>
<b>H/PF4/Ab(51)</b>	18(36%)	24(47%)	9(17%)	59%	41%
<b>HIT(50)</b>	20(40%)	21(42%)	9(18%)	61%	39%
<b>HITT(53)</b>	23(43%)	24(45%)	6(12%)	66%	34%
<b>Controlli letteratura</b> (Gruel et al, 2004)	35%	49%	16%	59,5%	40,5%
<b>Controlli Padova(72)</b>	28%	40%	32%	48%	52%

L'analisi statistica è stata eseguita dopo aver verificato che il polimorfismo seguisse l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Il gruppo dei controlli eseguiti a Padova non è in equilibrio di Hardy-Weinberg e differisce in modo significativo dalle frequenze dalla letteratura, nonostante il lavoro si riferisca alla popolazione caucasica. Gli altri gruppi seguono l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nel gruppo HITT è presente una diminuzione della frequenza del genotipo V/V 158 ed un aumento del genotipo F/F 158, sia rispetto al gruppo H/PF4/Ab che al gruppo HIT, anche se tali differenze, utilizzando il test del  $\chi^2$ , non risultano statisticamente significative (Tab. 6). Lo stesso andamento si può notare considerando l'aumento dell'allele F158 e la diminuzione dell'allele V158 nel gruppo HITT rispetto agli altri due gruppi in analisi, anche se tali differenze non sono statisticamente significative (Fig. 18). Non vi è invece aumento del genotipo V/V nel gruppo HIT rispetto al gruppo con i soli anticorpi.



**Figura 18:** Istogrammi relativi alle frequenze (%) di genotipi e alleli per il polimorfismo F158V del gene *FCGR3A*. I controlli riportati si riferiscono ai valori della letteratura.

Il gene *GpIIIa* presenta un polimorfismo, L33P, conosciuto col nome di HPA1 a/b, indicando come b l'allele raro (Prolina 33). Tale variazione genetica è stata studiata con una discriminazione allelica in Real Time PCR, utilizzando sonde specifiche TaqMan per gli alleli a e b. I genotipi dei pazienti vengono determinati dal confronto con i controlli utilizzando un software per Real Time PCR (SDS, sequence detection system, software, Applied Biosystems) (Fig. 19).



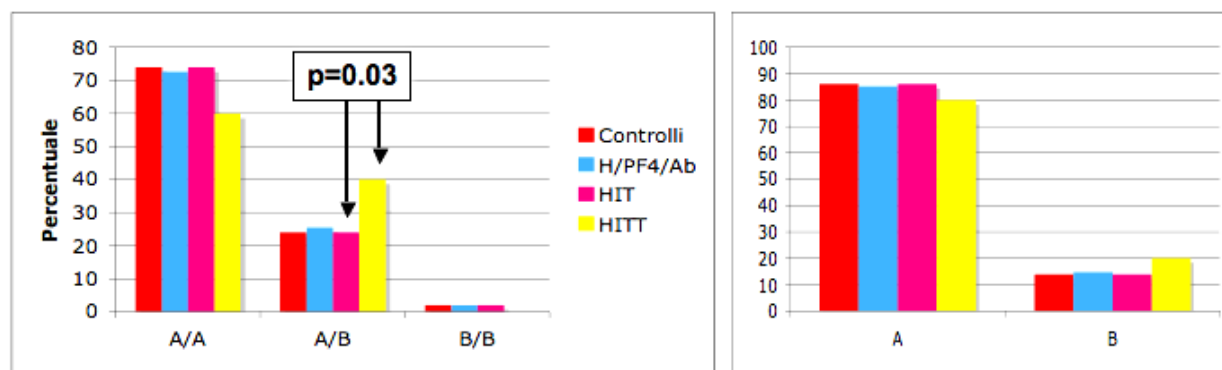
**Figura 19: Discriminazione allelica in real time PCR:** Il software SDS genera, dopo l'amplificazione, il plot qui raffigurato, dove la posizione dei diversi campioni è indicata da un punto colorato. In rosso sono indicati i pazienti in cui è stata rilevata la presenza solo dell'allele b (Prolina 33), sull'asse delle x, mentre in blu sono indicati i campioni in cui è stata rilevata solamente la presenza dell'allele a (Leucina 33), sull'asse delle y. I pazienti eterozigoti si trovano sulla diagonale del plot, indicati in verde.

**Tabella 7: Frequenze rilevate nei campioni analizzati per il polimorfismo HPA1 (L33P) del gene *GpIIIa*.** Al lato del nome del gruppo è indicato, tra parentesi, il numero di soggetti per ogni gruppo. In tabella le frequenze percentuali sono indicate tra parentesi, mentre il numero di soggetti per ogni genotipo è indicato fuori parentesi.

	a/a	a/b	b/b	a	b
<b>H/PF4/Ab(51)</b>	37(72,5%)	13(25,5%)	1(2%)	85,3%	14,7%
<b>HIT(50)</b>	37(74%)	12(24%)	1(2%)	86%	14%
<b>HITT (53)</b>	32(60%)	21(40%)	0	80%	20%
<b>Controlli letteratura</b> (Bontadini et al, 2000)	74%	24%	2%	86%	14%
<b>Controlli Padova (50)</b>	74%	24%	2%	86%	14%

Le frequenze dei polimorfismi osservate per i controlli nel nostro studio rispecchiano perfettamente i valori riscontrati in letteratura (Tab 7). Nel gruppo HITT la frequenza del genotipo a/b è aumentata in modo evidente rispetto sia al gruppo HIT che H/PF4/Ab. Dopo aver verificato che il polimorfismo fosse in equilibrio di Hardy-Weinberg, si è effettuata l'analisi statistica. Calcolando la differenza tra i dati osservati e attesi con il test del  $\chi^2$ , si ottiene una differenza statisticamente significativa tra i genotipi del gruppo HIT e HITT con una p pari a 0.03 (Fig. 20).

La differenza tra le frequenze alleliche di a e b non risulta invece statisticamente significativa nè tra HITT e HIT nè tra HITT e H/PF4/Ab.



**Figura 20:** Istogrammi relativi alle frequenze (%) di genotipi e alleli per il polimorfismo HPA1 (L33P) del gene *GpIIIa*.



### **Analisi Multivariata dei polimorfismi studiati**

Con il software SPSS 16.0 è stata eseguita una Multivariate regression analysis per valutare l'associazione tra i polimorfismi e i gruppi di pazienti. Non si sono ottenuti risultati significativi per l'associazione dei polimorfismi con il gruppo HIT confrontato con il gruppo H/PF4/Ab, né con l'unione del gruppo HIT con HITT rispetto al gruppo con i soli anticorpi. Confrontando invece i gruppi HIT e HITT si è ottenuto un valore di p vicino alla significatività statistica. In particolare mettendo insieme il genotipo R/R per FcγRIIA e a/b per HPA1 (più frequenti nella HITT, come risulta dalla prima parte dell'analisi), in relazione con la comparsa di trombosi (gruppo HIT contro HITT), si ottiene un'associazione tra questi due polimorfismi e la HITT con una  $p = 0.07$ . Unendo all'analisi anche il polimorfismo L125V di PECAM1 (genotipo V/V), la p si abbassa a 0,08.



## DISCUSSIONE

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una grave complicazione della terapia eparinica, la forma più frequente di piastrinopenia indotta da farmaci, ed è caratterizzata da un marcato calo del numero delle piastrine (> 30%). Nel 30-50% dei casi può essere complicata da episodi trombotici, sia venosi che arteriosi (Fabris F et al, 2000). La patogenesi della malattia è immunomediata, caratterizzata dalla formazione di anticorpi rivolti contro un complesso formato da Eparina (H), a dosi terapeutiche, e Fattore piastrinico 4 (PF4). Il PF4, rilasciato dalle piastrine o dalla superficie delle cellule endoteliali, si associa in tetrameri carichi positivamente, che legano eparina, carica negativamente. Il legame con eparina provoca un cambiamento conformazionale della proteina, che non viene più riconosciuta come propria dal sistema immunitario (Warkentin TE, 2003). Gli immunocomplessi, formati da anticorpi (principalmente di classe IgG), eparina e PF4 (A/PF4/Ab) si legano ed attivano le piastrine tramite il recettore FcγRIIA, portando poi alla formazione di microaggregati piastrinici e trombina (e in alcuni casi a trombosì) e alla successiva rimozione delle piastrine da parte dei macrofagi, tramite il recettore FcγRIIIA (Fabris et al, 2002). La molecola di adesione PECAM1 regola negativamente l'attivazione piastrinica mediata da FcγRIIA, tramite alcuni domini inibitori in grado di bloccare i siti attivatori del recettore per gli immunocomplessi, nonostante il meccanismo non sia stato ancora del tutto chiarito (Kroll et al, 2000).

Una diagnosi corretta della trombocitopenia da eparina si basa sia su criteri clinici, sia sulla dimostrazione della presenza e funzionalità degli anticorpi contro il complesso H/PF4. Lo score clinico maggiormente utilizzato è quello delle "4T" (Lo GK, 2006), che tiene conto dell'entità e del timing di insorgenza del calo piastrinico, di eventuali altre cause di trombocitopenia e della presenza o meno di nuovi episodi trombotici. Per i pazienti con score 4T inferiore a 3 la diagnosi di HIT è improbabile, tra 4-6 è possibile, con score maggiore di 6 la diagnosi è altamente probabile.

Esistono due tipi di test di laboratorio per determinare presenza ed azione degli anticorpi anti H/PF4: quelli immunologici e quelli funzionali. I test immunologici, generalmente ELISA, determinano la presenza di anticorpi contro il complesso H/PF4 nel plasma dei pazienti; i test funzionali determinano la capacità di tali anticorpi di attivare o far aggregare le piastrine di donatori, in presenza di eparina.

Nonostante la patogenesi della HIT sia ormai stata ampiamente studiata, anche con modelli animali (Reilly, 2001), rimane da chiarire perché non tutti i pazienti che sviluppano H/PF4/Ab vanno incontro alla trombocitopenia, e solo alcuni di questi sviluppano complicanze tromboemboliche. Alcuni polimorfismi genetici, riscontrati su alcuni recettori piastrinici e monocitari, sembrano essere coinvolti nell'insorgenza o meno della piastrinopenia in pazienti con anticorpi H/PF4, o nella comparsa di uno stato protrombotico che porti alle complicazioni della HIT (Carlsson L et al, 2003).

In questo studio si sono presi in considerazione in particolare quattro differenti polimorfismi genetici potenzialmente implicati nell'insorgenza di HIT o HITT: FcγRIIA-H131R, GpIIb/IIIa-HPA1, PECAM1-L125V (polimorfismo in linkage disequilibrium con S563N e R670G, i tre vengono quindi ereditati come "blocco unico") e FcγRIIIA-F158V.

Sono state valutate le eventuali differenze nelle frequenze alleliche e genotipiche tra tre gruppi di pazienti selezionati utilizzando lo score clinico delle 4T, due diversi test immunologici (un ELISA commerciale GTI, e uno "in House") e il test funzionale HIPA (heparin induced platelet activation):

1. H/PF4/Ab (51 pazienti): Tutti questi soggetti erano positivi al test immunologico, e la maggior parte delle O.D. determinate con i due test ELISA (GTI e "in house") rientrava nel range di valori tra 1.0 e 2.0. I sieri di questi pazienti non erano in grado di attivare in vitro le piastrine dei donatori, con nessuna concentrazione di eparina (test HIPA negativo). I pazienti non mostravano alcun sintomo clinico di HIT, il 4T score medio era 1.

2. HIT (50 pazienti): Questi pazienti presentavano trombocitopenia ed avevano un 4T score medio di 4,5. In tutti i campioni erano presenti anticorpi contro il complesso H/PF4, anche se con O.D. diverse tra i due ELISA. I due test correlavano perfettamente nel dare una risposta di presenza o assenza di anticorpi, ma le O.D del test immunologico GTI risultavano più alte rispetto al test "in house" utilizzato sui campioni provenienti del centro di Greifswald. (Tali differenze erano solamente da imputare al diverso coating della piastra, ai diversi reagenti e substrati utilizzati). Per i campioni analizzati con il test GTI, la classe di O.D. più rappresentata era quella con valori oltre 3 (12 pazienti su 18), mentre per l'ELISA "in house" la classe con valori tra 1.0 e 2.0 conteneva la maggior parte dei pazienti (29 su 32). Tutti i campioni di siero testati attivavano le piastrine di tre o quattro donatori, con il test HIPA. Gli anticorpi presenti nel siero di questi pazienti erano quindi in grado di causare attivazione ed aggregazione piastrinica, e quindi potenzialmente di causare trombocitopenia.
3. HITT (53 pazienti): Questi pazienti presentavano, oltre alla trombocitopenia, nuovi episodi trombotici sia di natura venosa che arteriosa, con un 4T score medio di 6,7. Tutti i campioni sono risultati positivi al test ELISA e al test HIPA. Sono state misurate O.D. diverse per i pazienti analizzati con test ELISA GTI e "in house", anche per questo gruppo infatti i valori ottenuti con l'ELISA commerciale erano più alti, e 8 pazienti su 10 avevano un' O.D oltre 3. Per i pazienti testati con ELISA "in house" invece, anche per il gruppo HITT, la classe più rappresentata di valori era tra 1.0 e 2.0 di densità ottica (40 pazienti su 43). Gli anticorpi presenti nel siero di questi pazienti erano in grado di causare attivazione ed aggregazione piastrinica (test HIPA positivo), e quindi potenzialmente di causare la trombocitopenia e le complicanze trombotiche ad essa correlate.

Il test ELISA GTI sembra correlare meglio con il fenotipo clinico dei pazienti, le O.D. sono più basse nei pazienti asintomatici, e mostrano valori più alti nel

gruppo HIT e ancora di più nel gruppo HITT, dove nessun paziente ha valori inferiori a 2.0. Nel caso del test immunologico di Greifswald, invece, le OD si concentrano sempre nello stesso range di valori (tra 1.0 e 2.0) per tutti i gruppi. Vi sono numerose evidenze anche in letteratura che dimostrano come i titoli anticorpali siano più elevati nei pazienti con HIT rispetto ai pazienti con H/PF4/Ab (Eichler P et al, 1999; Lindhoff-Last et al, 2001), e nei pazienti HITT rispetto ai pazienti con sola trombocitopenia (Fabris et al, 2002). L'osservazione trova giustificazione nel fatto che più alto è il titolo anticorpale, maggiore sarà la generazione di trombina e lo stato protrombotico.

In tutti i pazienti appartenenti ai tre gruppi sono stati studiati i polimorfismi genetici in analisi con diverse tecniche di biologia molecolare: per FcγRIIA-H131R, PECAM1-L125V e FcγRIIIA-F158V è stata messa a punto una PCR allele-specifica; per il polimorfismo HPA1, invece, una discriminazione allelica in real time PCR, utilizzando sonde Taqman.

Prima di procedere all'analisi statistica dei risultati è stato confermato per ogni polimorfismo il rispetto dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. Il software SPSS 16.0 è stato utilizzato per un'indagine statistica in due step, considerando dapprima i polimorfismi come variazioni genetiche indipendenti, e, in seguito, cercando di associarli tra loro e con la comparsa della HIT e della HITT.

Le differenze tra le frequenze alleliche e genotipiche dei tre gruppi di pazienti per ogni singolo polimorfismo sono state analizzate con il test statistico del  $\chi^2$ .

Il recettore FcγRIIA presenta un polimorfismo nella regione extracellulare, H131R, che interferisce con la capacità di interagire con gli immunocomplessi. Nel nostro studio si è evidenziata una correlazione tra genotipo e manifestazioni cliniche della HIT: il genotipo R/R è risultato maggiormente rappresentato nei pazienti HIT con complicanze tromboemboliche (HITT) rispetto ai pazienti HIT con sola trombocitopenia ( $p=0,0052$ ). Tale differenza nelle frequenze di questo genotipo non è però presente tra i pazienti con H/PF4/Ab e HIT (risultati riportati in Tab. 4 e Fig. 13). Lo stesso aumento si può notare confrontando le frequenze dei singoli alleli di H131 e R131,

quest'ultimo, infatti, è più frequente nel gruppo HITT rispetto al gruppo HIT ( $p=0,029$ ). A parità di presenza di anticorpi e trombocitopenia, quindi, i pazienti con genotipo R/R, o allele R, sembrano presentare un maggior rischio di sviluppare trombosì.

In letteratura molti autori si sono occupati della relazione tra il polimorfismo H131R e la comparsa della HIT e della HITT. In diversi lavori, il genotipo H/H viene considerato come "High-binding" per le IgG2 e dovrebbe essere il più rappresentato in pazienti HIT e HITT (Karassa et al, 2004). Altri autori non confermano tale ipotesi e dimostrano che non c'è differenza nella distribuzione genotipica e allelica del polimorfismo tra i due gruppi (Gruel Y, 2004). Il nostro studio è invece in linea con un lavoro di Pouplard del 1999, secondo il quale non sembra esserci un aumento di H/H nei pazienti HIT, ma di R/R nei pazienti con trombocitopenia e trombosì (HITT). Questo risultato è inoltre confermato da due lavori di Carlsson (Carlsson et al, 1998; Carlsson et al, 2003), eseguiti su un campione di 54 pazienti con HIT e 68 con HITT ( $p=0,036$ ), in cui si ipotizza che le piastrine dei pazienti con genotipo R/R rimangano in circolo più a lungo, aumentando lo stato protrombotico, mentre le piastrine che nel loro recettore portano il setting H/H vengono eliminate più velocemente. Infine esistono anche numerose evidenze in letteratura che l'allele R 131 sia un fattore di rischio per la manifestazione di altre malattie mediate da immunocomplessi, come il Lupus Eritematoso Sistemico (Rascu A et al, 1997). Questo polimorfismo non sembra quindi avere un impatto nella comparsa degli anticorpi né nello sviluppo delle manifestazioni cliniche della HIT, ma una volta che la HIT si è manifestata, i pazienti con genotipo R/R sono a maggior rischio per lo sviluppo di complicanze trombotiche.

La molecola di adesione PECAM 1 svolge un ruolo inibitorio nei confronti di Fc $\gamma$ RIIA, con meccanismi ancora non definitivamente chiariti. I polimorfismi che sono stati inseriti nello studio sono tre: L125V, S563N e R670G, in linkage disequilibrium tra loro, e quindi ereditati come blocco unico; l'analisi è stata condotta su due di essi, i più lontani (L125V e R670G). Il primo polimorfismo è stato analizzato in tutti i pazienti, mentre R670G è stato analizzato in circa la

metà dei pazienti per confermare che fosse sempre associato al primo. Tutti i pazienti omozigoti L/L125, lo erano anche per R/R 670, lo stesso avveniva per i soggetti V/V125 che erano anche omozigoti G/G 670. Gli eterozigoti analizzati lo erano per entrambi i polimorfismi: il crossover infatti non è mai stato osservato tra questi due polimorfismi nella popolazione caucasica (Novinska M, 2006). Dalla nostra analisi risulta che il genotipo V/V 125, e quindi il setting VNG, è aumentato nel gruppo HIT rispetto al gruppo H/PF4/Ab, e tale aumento risulta più marcato nel gruppo HITT, sia rispetto ai pazienti con sola trombocitopenia che rispetto ai pazienti con gli anticorpi (Tab.5; Fig. 16). L'analisi statistica ha mostrato però che tali differenze non sono statisticamente significative né per il genotipo V/V né per l'allele V. Probabilmente questo è dovuto anche all'esiguo numero di pazienti analizzati. Aumentando la casistica, le differenze di frequenze dei genotipi e degli alleli potrebbero risultare più evidenti e raggiungere la significatività statistica. Non vi sono lavori in letteratura che mettano in relazione questi polimorfismi con la trombocitopenia da eparina. Gli autori si sono infatti concentrati sulla relazione esistente tra questi setting polimorfici e la malattia coronarica, o le patologie cardiache in generale. Il genotipo VNG sembra alterare la migrazione transendoteliale dei monociti aumentando il rischio di aterosclerosi, ed è quindi, in generale, associato a un tipo di evento cronico; mentre il genotipo LSR modula l'attivazione piastrinica e aumenta il rischio di infarto al miocardio, e può essere quindi collegato ad eventi acuti (Elrayess M.A et al, 2004, 2005). Possiamo ipotizzare che le variazioni di aminoacido nelle zone dei domini Ig-like (dove si trovano L125V, S563N) e nel dominio intracellulare (dove si trova R670G) modifichino la capacità di interazione di PECAM1 con gli altri recettori, come FcγRIIA. E' quindi possibile che il setting VNG svolga un ruolo di inibizione minore sul recettore degli immunocomplessi, portando a maggiore attivazione piastrinica. Tale ruolo della molecola PECAM1 rispetto al recettore FcγRIIA deve però essere analizzato a fondo tramite studi biochimici in vitro per valutare



l'eventuale attività inibitoria delle due isoforme (LSR o VNG) dopo stimolo del recettore con immunocoplessi H/PF4/Ab.

Il recettore Fc $\gamma$ RIIIA, presente nei monociti, è deputato all'eliminazione delle piastrine sensibilizzate con IgG. In questo studio è stato analizzato il polimorfismo F158V, nella porzione extracellulare della molecola. Oltre ai pazienti dei tre gruppi, sono stati genotipizzati alcuni donatori sani provenienti principalmente dal Veneto, per verificare che le frequenze per i soggetti di controllo fossero in linea con quelle riportate dalla letteratura. Nel caso di questo polimorfismo però si sono riscontrate frequenze alleliche e genotipiche molto diverse, nonostante il gruppo di controllo sia stato ampliato da 50 a 72 donatori (Tab 6). Il confronto è stato effettuato con diversi lavori della letteratura, che riportano tutti frequenze simili tra loro per la popolazione caucasica (Gruel et al, 2004; Gavasso et al, 2005). Probabilmente tali differenze sono dovute alla scarsa numerosità del gruppo dei controlli, che sicuramente dovrà essere aumentato almeno a 200 soggetti per valutare nuovamente le frequenze e determinare se effettivamente la popolazione veneta presenti una distribuzione diversa di questo polimorfismo (effetto fondatore). Per il presente studio sono state quindi indicate come frequenze di controllo quelle date dalla letteratura (Fig. 18). Questo limite non riguarda la casistica dei pazienti, essendo i vari gruppi composti anche da soggetti tedeschi. Questo polimorfismo funzionale induce un aumento di attività dei monociti e delle cellule NK negli omozigoti V/V, perciò i macrofagi V/V sarebbero più efficaci nell'eliminare gli immunocoplessi (Gavasso S et al, 2005). Dai nostri dati non risultano differenze di frequenza del genotipo V/V158 o dell'allele V tra il gruppo con i soli anticorpi e il gruppo di pazienti con trombocitopenia, contrariamente a quanto riportato dal lavoro di Gruel (Gruel, 2004), nel quale comparando pazienti con soli anticorpi e pazienti HIT, si osserva un aumento significativo della frequenza dell'omozigote V/V nei pazienti HIT. Dai dati ottenuti possiamo inoltre osservare una diminuzione della frequenza del genotipo V/V nel gruppo

con trombosi, anche se non significativa (Tab.6; fig18), la stessa tendenza si può riscontrare nello studio di Gruel dove gli omozigoti V/V risultano più frequenti tra i pazienti HIT rispetto a quelli del gruppo HITT (in modo non significativo). Il nostro lavoro, pur suggerendolo, non permette perciò di affermare in modo definitivo che i pazienti V/V abbiano un più alto rischio di sviluppare la HIT, né che gli stessi V/V158 siano “protetti” contro le trombosi. Per avvalorare tale ipotesi sarebbe infatti necessario aumentare la casistica in studio.

Il quarto polimorfismo studiato si trova sulla glicoproteina piastrinica GpIIIa, che insieme alla GpIIb forma il recettore per il fibrinogeno. Il polimorfismo L33P, chiamato anche HPA1, si trova nella regione extracellulare. Le piastrine dei soggetti che portano l'allele raro b (prolina 33), soprattutto in omozigosi (2% dei soggetti sani, Bontadini et al, 2000), presentano una maggiore capacità di legame con il fibrinogeno e quindi una maggior aggregabilità. Secondo un recente studio di Harris (Harris K et al, 2008), il polimorfismo HPA1 può influenzare il rischio trombotico nella trombocitopenia da eparina. Harris dimostra infatti che la presenza dell'allele b, anche in eterozigosi, è associata ad un incremento dell'incidenza di trombosi, soprattutto arteriose, nei pazienti HIT. Dall'analisi genetica condotta sui nostri gruppi di pazienti si può notare che nel gruppo HITT la frequenza del genotipo a/b è aumentata in modo evidente rispetto sia al gruppo HIT che a quello H/PF4/Ab, ottenendo una differenza statisticamente significativa tra i genotipi del gruppo HIT e HITT con una p pari a 0.03 (Tab.7; Fig. 20). I nostri risultati confermano quindi quelli di Harris, mentre contraddicono altri lavori che sostengono non vi sia associazione tra l'allele raro b e il rischio trombotico nei casi di HIT (Carlsson et al, 2003).

Dall'analisi statistica condotta su ogni singolo polimorfismo, non sono emerse differenze significative tra il gruppo con i soli anticorpi, H/PF4/Ab, e il gruppo che sviluppa piastrinopenia (HIT). Questo è dovuto probabilmente anche al ridotto numero di pazienti inseriti nello studio, ma data la rarità della patologia non è stato possibile raggiungere un buon potere statistico. Inoltre, a parità di

presenza di anticorpi anti eparina, anche altri polimorfismi potrebbero giocare un ruolo nella comparsa della trombocitopenia.

Dal confronto delle frequenze dei polimorfismi tra il gruppo HIT e HITT sono invece emerse alcune differenze significative. La frequenza del genotipo R/R (FcγRIIA) è aumentata nel gruppo HITT ( $p < 0,05$ ), così come la frequenza del genotipo a/b (HPA1) ( $p < 0,05$ ). Anche la frequenza del setting polimorfico VNG (V/V125-N/N563-G/G670) per il recettore PECAM1 è aumentata nel gruppo HITT rispetto agli altri gruppi, anche se non in modo statisticamente significativo.

Per valutare il ruolo dell'associazione tra i polimorfismi risultati significativi e la presenza o meno di complicanze trombotiche (gruppo HIT contro HITT), siamo passati alla seconda fase dell'analisi statistica, utilizzando una "Multivariate regression analysis". Considerando insieme i genotipi R/R per FcγRIIA e a/b per HPA1, in relazione con la comparsa di trombosi, si ottiene un'associazione tra questi due genotipi e la HITT con una  $p = 0,07$ . Nonostante i due polimorfismi presi singolarmente avessero un peso statistico maggiore (test del  $\chi^2$  con  $p < 0,05$ ), una volta associati perdono in significatività, probabilmente perché non tutti i pazienti HITT portatori del genotipo R/R131, presentano anche l'allele b per HPA1. Lo stesso avviene se si aggiunge all'analisi multivariata anche il polimorfismo L125V di PECAM1 (genotipo V/V, setting VNG). In questo caso, infatti, la significatività statistica si abbassa ulteriormente a  $p = 0,08$ , dato che pochi pazienti che possiedono il setting R/R e a/b, sono portatori anche del genotipo V125 per PECAM1.

Questa riduzione di significatività statistica è sicuramente dovuta anche al ridotto numero di pazienti in studio, soprattutto per quanto riguarda il polimorfismo HPA1, data la rarità dell'allele b (2% di omozigosi nella popolazione caucasica). Probabilmente, aumentando la casistica, sarà possibile raggiungere la significatività statistica per l'associazione del setting polimorfico 131R/R; HPA1 a/b; 125V/V con l'insorgenza di complicanze trombotiche nella trombocitopenia da eparina.



## CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato determinare se i polimorfismi genetici dei recettori piastrinici e monocitari in analisi fossero o meno implicati nell'insorgenza della trombocitopenia da eparina, o nelle complicanze trombotiche della patologia, a parità di presenza di anticorpi rivolti contro il complesso eparina/fattore piastrinico 4. In particolare si intendeva determinare un setting polimorfico maggiormente associato alla HIT o alla HITT.

Dai risultati ottenuti non siamo in grado di determinare variazioni genetiche coinvolte nella comparsa di trombocitopenia; nessuno dei polimorfismi in analisi è risultato infatti associato in modo significativo alla HIT.

Alcuni polimorfismi hanno però mostrato un'associazione con la comparsa di trombosi in pazienti con trombocitopenia da eparina. In particolare il genotipo R/R per il polimorfismo H131R di Fc $\gamma$ RIIA, e il genotipo a/b per HPA1 di GpIIIa sono più rappresentati nel gruppo di pazienti HITT rispetto al gruppo HIT, entrambi con una  $p < 0,05$  (test  $\chi^2$ ). Anche il genotipo V/V per L125V (setting VNG per il linkage disequilibrium) di PECAM1 è più frequente nel gruppo con trombosi rispetto al gruppo HIT anche se con una  $p$  non statisticamente significativa.

Insieme questi polimorfismi potrebbero quindi creare un setting genetico che porti una maggior frequenza trombotica nella trombocitopenia da eparina. Infatti per l'associazione dei genotipi R/R e a/b con la HITT, abbiamo ottenuto un valore di  $p$  vicino alla significatività ( $p=0,07$  Multivariate regression analysis). Dato il numero ridotto di soggetti in studio, dovuto alla rarità della malattia, possiamo supporre che aumentando la casistica potremo riuscire ad ottenere un'associazione statisticamente significativa ( $p<0,05$ ) tra questi polimorfismi e il rischio trombotico associato alla HIT.



## BIBLIOGRAFIA

1. Arepally G, McKenzie SE, Jang XM, Poncz M, Cines DB. FcγRIIA H/R 131 polymorphism, subclass specific IgG anti Heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with HIT. *Blood* 1997; 89: 370-75.
2. Blank M, Shoenfeld Y, Tavor S, Praprotnik S, Boffa MC, Weksler B, Walenga JM, Amiral J, Eldor A. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *International Immunology*. 2001;14: 121-129.
3. Bontadini A, Tazzari PL, Manfroi S, Ruscitto MC, Fruet F, Conte R. Human platelet antigen and neutrophil antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica*, 2000; 85:430-31
4. Brandt JT, Isenhardt CE, Osborne JM, Ahmed A, Anderson CL. On the role of platelet FcγRIIA phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 1995;74(6):1564-72.
5. Bryant A, Low J, Austin S, Joseph JE. Timely diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia in a frequent request, low incidence single centre using clinical 4T's score and particle gel immunoassay. *Br.J.Haematol*. 2008;143:721-726.
6. Canobbio I, Stefanini L, Guidetti GF, Balduini C, Torti M. A new role for FcγRIIA in the potentiation of platelet activation induced by weak stimulation. *Cell.Sig*. 2006 18: 861-870.
7. Carlsson LE, Santoso S, Baurichter G, Kroll H, Papenberg S, Eichler P, Westerdaal NA, Kiefel V, van de Winkel JG, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcγRIIA-R-H131 polymorphism. *Blood*. 1998;92(5):1526-31.
8. Carlsson LE, Lubenow N, Blumentritt C, Kempf R, Papenberg S, Shroder W, Eichler P, Herrmann FH, Santoso S, Greinacher A. Platelet receptor

and clotting factor polymorphisms as genetic risk factors for thromboembolic complications in heparin-induced thrombocytopenia. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 253-258.

9. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2003;1:1471-1478.
10. Collins JL, Aster RH, Moghaddam M. Diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia (HIT): an enhanced platelet factor 4 complex enzyme linked immunosorbent assay (PF4 ELISA). *Blood*. 1997;90 (Suppl 1): 761.
11. Denomme, G.A., Warkentin, T.E., Horsewood, P., Sheppard, J.I., Warner, M.N. & Kelton, J.G. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the FcγRIIa 'low responder' (His131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1997, 130, 278-284
12. Denys B, Stove V, Philippe J, Devreese K. A clinical-laboratory approach contributing to a rapid and reliable diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb.Res.* 2008;123:137-145.
13. Eichler P, Budde U, Haas S, Kroll H, Loreth RM, Meyer O, Pachmann U, Pötzsch B, Schabel A, Albrecht D, Greinacher A. First workshop for detection of heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet-activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. *Thromb Haemost.* 1999;81(4):625-9.
14. Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GJ, Whittall RA, Kabir J, Hawe E, Syvanne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesaniemi YA, Pasternack A, Miller GJ, Humphries SE. R643G polymorphism in PECAM-1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):127-35.
15. Elrayess MA, Talmud PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) & coronary heart disease. *Indian J Med Res.* 2005;121(2):77-9.



16. Fabris F, Cordiano I, Luzzatto G, Cella G, Girolami A. Heparin-induced thrombocytopenia: prevalence in a large cohort of patients and confirmed role of PF4-heparin complex as the main antigen for antibodies. *Clin Appl Thromb Haemost*. 1997;3:203-209.
17. Fabris, F., Ahmad S, Cella G, Jeske WP, Walenga JM, Fareed J. Pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia. Clinical and diagnostic implication , a review. *Arch.Pathol.Lab.Med*.2000;124:1657-66.
18. Fabris F, Luzzato G, Stefani PM, Girolami B, Cella G, Girolami A. Heparin-induced Thrombocytopenia. *Haematologica* 2000; 85:72-81.
19. Fabris F, Luzzato G, Soini B, Ramon R, Scandellari R, Randi ML, Girolami A. A risk factor for thrombosis in patients with immune mediated heparin-induced Thrombocytopenia. *J Intern Med* 2002;252:149-54.
20. Fausett MB, Vogtlander M, Lee RM, Esplin MS, Branch DW, Rodgers GM, Silver RM. Heparin-induced thrombocytopenia is rare in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(1):148-52.
21. Fondu P. Heparin-associated thrombocytopenia: an update. *Acta Clin Belg*. 1995;50(6):343-57. Review.
22. Gavasso S, Nygard O, Pedersen ER, Aarseth JH, Bleie O, Myhr KM, Vedeler CA. Fcg receptor IIIA polymorphism as a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 180:277-282.
23. Girolami B, Prandoni P, Stefani PM, Tanduo C, Sabbion P, Eichler P, Ramon R, Baggio G, Fabris F, Girolami A. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin. A prospective cohort study. *Blood*,2003;101:2355-59.
24. Greinacher A, Michelis I, Kiefel V, Mueller-Heckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosis heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 1991; 66:734-736.
25. Gruel Y, Pouplard C, Dominique Lasne, Charlotte Magdelaine-Beuzelin, Chloé Charroing, and Hervé Watier The homozygous FcgRIIIa-158V

- genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes *Blood*, 2004; 104; 9: 2791-2793.
26. Grumet FC, Hiraki DD, Brown BW, Zehnder JL, Zacks ES, Draksharapu A, Parnes J, Negrin RS. CD31 Mismatching affects marrow transplantation outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001; 7:503-512.
  27. Gulen F, Tanac R, Altinoz S, Berdeli A, Zeyrek D, Koksoy H, Demir E. The Fc gammaRIIa polymorphism in Turkish children with asthma bronchial and allergic rhinitis. *Clin Biochem*. 2007;40(5-6):392-6.
  28. Haines ST, Bussey HI. Thrombosis and the pharmacology of antithrombotic agents. *Ann Pharmacother* 1995;29:892-905.
  29. Harris K, Nguyen P, E M. Van Cott, Platelet PLA2 Polymorphism and the Risk for Thrombosis in Heparin-Induced Thrombocytopenia *Am J Clin Pathol* 2008;129:282-286.
  30. Hirsh J, Raschke R, Warkentin TE, Dalen JE, Deykin D, Poller L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1995;108: 258S-75S.
  31. Juhl D, Eichler P, Lubenow N, Strobel U, Wessel A, Greinacher A. Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin induced thrombocytopenia. *European Journal of Haematology*, 2006; 76: 420-426.
  32. Karassa F.B. Trikalinos TA, Ioannidis JPA. The role of FcγRIIA and FcγRIIIA polymorphism in autoimmune disease. *Biomed & Pharmacoter*. 2004; 58: 286-91.
  33. Kelton JG, Sheridan D, Santos A, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. *Blood*. 1988; 72: 925-930.
  34. Kroll H, Sun Q, and Santoso S. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1) is a target in drug-induced thrombocytopenia *Blood* 2000;96:1409-1414.

35. Lindhoff-Last, Gerdson F, Ackermann H, Bauersachs R. Determination of heparin-platelet factor 4- IgG antibodies improve diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. *Br.J.Haematol*, 2001; 113: 886-890.
36. Lindhoff-Last E, Wenning B, Stein M, Gerdson F, Bauersachs R, Wagner R. Risk factors and long-term follow-up of patients with the immune type of heparin-induced thrombocytopenia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2002 8:347-52.
37. Lillo-Le LA, Boutouyrie P, Henc-Gelas M. Diagnostic score for heparin-induced thrombocytopenia after cardiopulmonary bypass. *J.Thromb.Haemost*. 2004;2:1882-1888.
38. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost*. 2006 ;4:759-65.
39. Luanfeng P, Peng P Signaling transduction by IgG receptors *Chin. Med. J*. 2003; 116: 487-94.
40. Novinska M, Pietz BC, Ellis TM, Newman DK, Newman PJ. The alleles of PECAM-1. *Gene*, 2006; 376: 95-101.
41. Pouplard C, May MA, Iochmann S, Amiral J, Vissac AM, Marchand M, Gruel Y. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin: clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation*. 1999 18;99:2530-6.
42. Pouplard C, Gueret P, Fouassier M et al. Prospective evaluation of the '4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J.Thromb.Haemost*. 2007;5:1373-1379.
43. Prandoni P, Siragusa S, Girolami B, Fabris F. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients treated with low-

- molecular-weight-heparin: a prospective cohort study. *Blood* 2005; 106: 3049-54.
44. Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, Arepally GM, Sachais BS, Cines DB, Poncz M, McKenzie SE. Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. *Blood*. 2001;98(8):2442-7.
  45. Rascu A, Repp R, Westerdaal NAC, Kalden JR, van de Winkel JGJ: Clinical relevance of Fcγ receptor polymorphisms. *Ann NY Acad Sci* 815:282,1997
  46. Rathore V, Stapleton MA, Hillery CA et al PECAM-1 negatively regulates GPIb/V/IX signaling in murine platelets. *Blood* 2003; 102:3658-3664.
  47. Salmon JE e Pricop L Human Receptors for Immunoglobulin G Arthritis *Rheumat* 2001;44(4): 739-750.
  48. Sanders LAM, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Rijkers GT, Capel PJA, Zegers BJM, van de Winkel JGJ: Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immunity* 1995; 63: 73.
  49. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1986; 67:27-30.
  50. Thai L, Ashman I, Harbour SN. Physical proximity and functional interplay of PECAM-1 with the Fc receptor FcγRIIIa on the platelet plasma membrane *Blood*. 2003; 102: 3637-3645.
  51. Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997; 98:648-656.
  52. Visentin GP, Moghaddam M, Beery SE, McFarland JG, Aster RH. Heparin is not required for detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *J.Lab Clin.Med*. 2001;138:22-31.

53. Wallis DE, Workman DL, Lewis BE, Steen L, Pifarre R, Moran JF. Failure of early heparin cessation as treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* 1999; 106:629-635.
54. Warkentin TE, Hayward CP, Smith CA, Kelly PM, Kelton JG. Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin.Med.* 1992;120:371-379
55. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-years study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* 1996;101:502-507.
56. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin induced thrombocytopenia: toward consensus. *Thromb Haemost.* 1998;79:1-7
57. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. *Thromb Haemost.* 1999;82:439-447.
58. Warkentin TE, Sheppard JI, Horsehood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2000;96:1703-1708.
59. Warkentin TE, Kelton JC. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia *N.Engl.J.Med.* 2001;344:1286-1292.
60. Warkentin TE. Heparin-induced Thrombocytopenia: Pathogenesis And Management. *British Journal of Haematology*, 2003; 121:535-55.
61. Warkentin TE, J Sheppard, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG. Quantitative interpretation of optical density measurement using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2008; 6: 1304–1312.
62. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996 25;334:1090-4
63. Wiesmann RE, Tobin RW. Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *Arch Surg.* 1958; 76:219.



## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare il Professor Fabrizio Fabris, per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto e per avermi seguito in questi tre anni di Dottorato.*

*Un grazie di cuore a tutto il "laboratorio piastrine", a chi c'è ancora e a chi c'è stato, splendide donne che sono ormai diventate per me una famiglia in questi anni, grazie a Silvia per aver pazientato e letto ogni singola riga di questa tesi.*

*Un grazie anche a tutti i componenti dello staff della medicina interna..dai medici alle segretarie, in particolare a Fabi per l'insuperabile apporto statistico.*

*Un grazie particolare va anche al Professor Andreas Greinacher e a tutto il "Thrombolabor" di Greifswald, per avermi aiutato a passare quattro mesi pieni e bellissimi.*

*Non mi resta che ringraziare i miei più cari amici e tutta la mia FAMIGLIA, senza la quale non avrei mai la serenità necessaria per affrontare le sfide della vita, e ovviamente "il povero ROCCO", così come tutti lo chiamano, per la sua infinita pazienza nel sopportare i miei mutevoli umori!*

*Pamela*