



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

### **Correlazione tra “Non Responsività ad Aspirina” e stato mutazionale di JAK2 in pazienti con Neoplasie Mieloproliferative cromosoma Philadelphia negative (MPNs)**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Supervisore :Ch.mo Prof.ssa Maria Luigia Randi

**Dottoranda: dr.ssa Enrica Pacquola**



*A Michele*

*“Il più bello dei mari  
è quello che non navigammo.  
Il più bello dei nostri figli  
non è ancora cresciuto.  
I più belli dei nostri giorni  
non li abbiamo ancora vissuti.  
E quello che vorrei dirti di più bello  
non te l’ho ancora detto”.*  
*(Nazim Hikmet)*



# INDICE

- *Introduzione* *pg 7*
- *Pazienti e  
Metodi* *pg 17*
- *Risultati* *pg 21*
- *Discussione* *pg 25*
- *Tabelle e Figure* *pg 29*
- *Bibliografia* *pg 49*

## **INTRODUZIONE**

Le patologie mieloproliferative croniche (Myeloproliferative Neoplasms – MPNs) sono entità ematologiche alquanto eterogenee, di origine clonale, coinvolgenti le tre principali filiere ematopoietiche (eritrociti, piastrine e leucociti), e sono il

risultato della trasformazione in senso mieloproliferativo di una cellula progenitrice mieloide.

La definizione biologica di tali patologie è rappresentata storicamente dall'assenza del cromosoma Philadelphia (cr Ph-), e del gene di fusione BCR/ABL prodotto dalla nota traslocazione t(9;22), che invece caratterizza la Leucemia Mieloide Cronica (CML) (cr Ph+) <sup>1,2</sup>.

I tre principali disordini mieloproliferativi (cr Ph- ) sono la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (ET) e la Mielofibrosi Idiopatica (IMF). Tuttavia la World Health Organization (WHO) include tra le neoplasie mieloproliferative anche patologie meno frequenti: mastocitosi sistemica, leucemia eosinofila cronica, leucemia neutrofila cronica e leucemia mielomonocitica cronica.

Gli aspetti fondamentali delle MPNs classiche sono l'incremento della massa eritrocitaria per la PV, l'aumento del numero delle piastrine per la ET e l'eccesso di fibrosi midollare per la IMF, tutte caratteristiche che si associano ad iperproliferazione midollare, predisposizione alla trombosi e all'emorragia, nonché, al rischio di trasformazione leucemica "long term". L'incidenza annuale delle MPNs è da 1 a 3 casi ogni 100.000/abitanti per la PV e la ET, mentre la IMF è più rara.

## CARATTERISTICHE PATOGENETICHE

Il primo clinico a dare una definizione alla Policitemia fu Vaquez <sup>3</sup> nel 1892 quando la descrisse come una condizione di "persistente ed eccessiva

ipercellularità accompagnata da cianosi”. Mentre si deve ad Epstein <sup>4</sup> nel 1930 la descrizione della Trombocitemia.

Ciononostante resta ancora Dameshek <sup>5</sup> il principale protagonista scientifico che negli anni '50 si dedicò all'approfondimento clinico e laboratoristico delle MPNs e che propose una possibile eziologia comune coniando a tal fine il termine di “disordini mieloproliferativi” proprio per enfatizzare lo spettro di condizioni cliniche interconnesse tra le diverse entità patologiche. Gli anni '70 furono fertili per le scoperte scientifiche riguardanti le MPNs: si dimostrò infatti la crescita spontanea in vitro di colonie eritroidi endogene (EEC) su materiale proveniente da midollo di pazienti policitemici in assenza di fattori di crescita<sup>6</sup>, e mediante studi basati sull'inattivazione del cromosoma X su sangue di donne policitemiche e trombocitiche, si documentò la natura clonale di queste malattie<sup>7</sup>. Tali evidenze suggerirono che le malattie mieloproliferative cr Ph- potessero in effetti avere origine dalla proliferazione clonale di una cellula staminale ematopoietica primitiva<sup>7</sup>.

#### LA MUTAZIONE V617F DEL GENE JAK2

Nel 2005 numerosi gruppi di ricercatori <sup>8,9,10,11,12</sup> hanno descritto la presenza di una mutazione acquisita puntiforme del gene Janus Kinase 2 (JAK2) nella maggior parte dei pazienti affetti da MPNs. JAK2 è una tirosina chinasi citoplasmatica, essenziale per la trasduzione dei segnali intracitoplasmatici, grazie al legame di alcune proteine ligando ai loro recettori di superficie: eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), interleuchina – 3 (IL-3), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) e granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Fig.1). E' stato dimostrato che modelli murini privi del gene JAK2 vanno incontro a morte intraembrionale e ad assenza completa di eritropoiesi, confermando così



l'importanza vitale di JAK2 come trasduttore di secondi messaggeri evocati dal legame dell'eritropoietina ad EPO-R e dalla successiva fosforilazione del suo dominio citoplasmatico<sup>2</sup>.

La più comune mutazione di JAK2, coinvolge l'esone 14 e consiste nella sostituzione aminoacidica di una valina al posto di una fenilalanina in posizione 617 del gene stesso (V617FJAK2). In un secondo tempo sono state poi descritte altre mutazioni di JAK2 a carico dell'esone 12, presenti in alcuni casi di PV<sup>16</sup>.

Numerosi studi hanno attualmente confermato che la mutazione V617F è ritrovabile nella quasi la totalità dei pazienti affetti da PV (90-95%), in circa il 50-60% dei pazienti affetti da ET o da IMF. La mutazione V617F di JAK2 è altresì presente in una piccola percentuale di pazienti affetti da altre malattie mieloproliferative: sindrome ipereosinofila, leucemia mielomonocitica cronica, mielodisplasia e leucemia mieloide cronica<sup>1,8</sup>.

Dal punto di vista biochimico, la JAK2 mutata è costituzionalmente attivata ed è responsabile dell'attivazione una serie di vie citochiniche, innescate dal legame di EPO ad EPO-R, oltre a JAK-STAT e PI3K: AKT, MAPK (miogeno-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) che inducono a loro volta una iperproliferazione midollare di globuli rossi e piastrine<sup>10</sup>.

Non si esclude che i pazienti JAK2 wild-tipe (WT) possano essere portatori di diverse mutazioni genetiche. Ad esempio, è oggi noto che circa 1% dei pazienti con ET e 5% di quelli con MF sono portatori di mutazioni a carico del recettore della trombopoietina (c-mpl)<sup>9,10</sup>.

## LA TROMBOSI

Le MPNs sono tipicamente complicate da episodi trombotici<sup>13,14,15,16,17,18,19</sup>.

Il primo episodio trombotico può verificarsi alla diagnosi o durante il periodo di follow up clinico. In una ricerca italiana<sup>18</sup> è stata calcolata una percentuale di tasso di ricorrenza della trombosi pari al 5,6% per paziente/anno e un tasso di rischio trombotico cumulativo pari al 49,9% a 10 anni. Peraltro, l'incidenza di trombosi e di retrombosi è stata molto variamente descritta: nella maggior parte delle coorti di pazienti analizzate sono stati compresi pazienti con trombosi pre-diagnosi, alla diagnosi o nel corso del follow-up<sup>20</sup>. Uno studio recente in cui viene valutata un'ampia coorte di pazienti con PV<sup>18</sup> ha documentato un'incidenza di trombosi del 5% in pazienti di età inferiore a 65 anni e dell'11% in quelli di età superiore a 65 anni. In un altro lavoro<sup>21</sup> l'incidenza di retrombosi in 85 pazienti con ET era intorno al 42% a 6 anni dal primo episodio.

I più comuni eventi ischemici nelle MPNs sono i disturbi del microcircolo (eritromelalgia, alterazioni del visus, TIA) che sono causa della maggior parte dei sintomi avvertiti dai pazienti.

Le trombosi del versante arterioso, ed in particolare l'infarto miocardico (IMA), l'ictus ischemico e l'arteriopatia obliterante degli arti inferiori, rappresentano la maggior parte degli eventi trombotici ricorrenti nella MPNs e costituiscono circa il 60 – 70% delle complicanze trombotiche nelle MPNs<sup>19,43,46</sup>.

Le trombosi del versante venoso (trombosi venosa profonda degli arti inferiori, trombosi portale, mesenterica e delle vene sovraepatiche) sono relativamente meno frequenti<sup>22,23,24,18</sup>.

L'età superiore a 60 anni e l'anamnesi positiva per precedenti episodi trombotici, sono i principali fattori di rischio per le complicanze trombotiche, mentre una piastrinosi maggiore di  $1500 \times 10^9/L$  è nota per essere un rischio maggiore di emorragia, dato che determina una forma acquisita di malattia di Von Willebrand<sup>19</sup>. E' tuttora dibattuto<sup>25</sup> che la presenza dei classici fattori di rischio cardiovascolare

(ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete, obesità e tabagismo) siano dei fattori di rischio protrombotico nelle MPNs (Tab 1).

Più di recente sono stati proposti due ulteriori candidati come fattori di rischio trombotico: la leucocitosi neutrofila alla diagnosi<sup>25,26,27</sup> e la presenza della suddescritta mutazione V617FJAK2<sup>28,29,30</sup> ma tali fattori di rischio devono ancora essere ancora validati.

Circa il rapporto leucocitosi-trombosi, Wolansky<sup>15</sup> in uno studio retrospettivo ha dimostrato che leucocitosi e piastrinosi incrementano il rischio di eventi trombotici come variabile indipendente. Pare anche che la leucocitosi si associ più facilmente agli eventi trombotici arteriosi rispetto a quelli venosi<sup>31</sup>. L'occlusione vasale aterosclerotica e la rottura della placca ateromasica offrono probabilmente un substrato alla leucocitosi per promuovere la trombosi<sup>32,33,34</sup>.

In accordo con quanto detto sopra, gli studi condotti da Falanga<sup>22,29</sup> hanno documentato l'importanza dei legami intercellulari che si creano tra piastrine e globuli bianchi nella patogenesi dell'infiammazione e della trombosi, specialmente nel versante arterioso.

Nel 2005 lo studio PT-1<sup>35</sup>, ha altresì documentato che i pazienti ad elevato rischio trombotico trattati con idrossiurea ed aspirina a basse dosi presentano una conta leucocitaria significativamente più bassa e un'incidenza di eventi trombotici arteriosi (sindrome coronarica acuta e eventi arteriosi cerebrali) inferiore rispetto a quelli trattati con anagrelide, suggerendo che l'azione mielosoppressiva esercitata dall'idrossiurea anche sui leucociti produca un risultato anti-trombotico (Fig 2).

Circa il rapporto trombosi e mutazione del gene JAK2, un recente lavoro<sup>36</sup> correla trombocitosi, leucocitosi e mutazione V617FJAK2, identificando così due diverse classi di rischio per eventi trombotici, da un lato pazienti "low risk" che presentano un'elevata conta piastrinica ( $> 1000 \times 10^9/L$ ), leucocitosi modesta ( $< 11 \times 10^9/L$ ), una più bassa prevalenza di mutazioni JAK2 e una minore incidenza di episodi

trombotici e dall'altro pazienti "high risk" che si caratterizzano invece per leucocitosi marcata ( $> 11 \times 10^9/L$ ), piastrinosi moderata ( $< 1000 \times 10^9/L$ ), più elevata prevalenza di mutazione del gene JAK2 ed una più alta incidenza di eventi trombotici. Altri Autori<sup>37</sup>, tuttavia, non hanno ottenuto i medesimi risultati.

## LA TERAPIA DI TROMBOCITEMIA E POLICITEMIA

La scelta terapeutica a cui avviare i pazienti con PV ed ET va stabilita in base al rischio, come suggerito dalle varie linee guida di trattamento per i pazienti con MPNs<sup>22,23,24</sup> (Tab 2).

Mentre nel caso della PV, la riduzione a livelli normali dell'ematocrito ottenuta con salassoterapia è ormai stata stabilita da molti anni<sup>39</sup> le scelte terapeutiche per il mantenimento di una adeguata crasi piastrinica sono più dibattute.

Esiste un sostanziale accordo sul fatto che solo i pazienti ad alto rischio vadano avviati a trattamento citoriduttivo, in prima linea con idrossiurea, e in seguito con anagrelide, interferone o alchilanti<sup>35</sup>, mentre sono attesi i nuovi farmaci anti-tirosinchinasici attualmente in fase 2 e 3<sup>62</sup> il cui utilizzo necessita ancora di chiara definizione.

Nel 2005 lo studio il PT-1<sup>35</sup> ha dimostrato infatti la superiorità dell'idrossiurea in associazione a basse dosi di aspirina rispetto all'anagrelide (inibitore della ploidia megacariocitaria e dell'aggregazione piastrinica) sempre associata all'aspirina nella prevenzione del rischio trombotico arterioso ma non venoso dei pazienti MPNs ad alto rischio. In particolare, la citoriduzione è apparsa efficace nella prevenzione della sindrome coronarica acuta e la terapia antiaggregante nella prevenzione degli eventi ischemici cerebrali. Anche in un recente lavoro di De Stefano<sup>38</sup> si è visto che avviando i pazienti alto rischio, al trattamento con idrossiurea si riduce il rischio di re-trombosi del versante arterioso del 50%, mentre l'effetto sul versante venoso sembra essere minore.

Nei pazienti a basso rischio si ritiene che probabilmente un atteggiamento di “watch and wait” sia il più appropriato.

I dubbi maggiori riguardano la terapia dei pazienti a rischio intermedio. Lo studio ECLAP (European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera)<sup>39</sup> ha riconosciuto l'efficacia e la sicurezza di basse dosi di aspirina (100 mg/die) nei malati con PV, confermando dati emersi negli anni precedenti<sup>40,41,42</sup>.

Basse dosi di aspirina riducono sensibilmente il rischio di trombosi arteriosa, senza aumento dei sanguinamenti maggiori e con una discreta riduzione dei disturbi del microcircolo come: eritromelalgia e sintomi neurologici transitori (disartria, emiparesi, amaurosi fugax, scotomi e parestesie). In generale e per estensione dell'esperienza nelle PV, l'aspirina a basse dosi viene utilizzata anche nei pazienti con ET per prevenzione delle complicanze cardio-vascolari, pur in assenza di parimenti documentata efficacia<sup>43,44,45</sup>.

L'eterogeneità biologica della trombocitemia, per il momento, rende molto difficile chiarire quali siano le migliori scelte terapeutiche e la relazione tra eventi trombotici, stato mutazionale ed efficacia del trattamento antiaggregante andrà valutata in studi prospettici.

#### LA NON RESPONSIVITA' ALL'ASPIRINA A BASSE DOSI

La principale causa di ischemia coronarica e di accidenti cerebrovascolari è l'aterosclerosi, ormai definita come disordine infiammatorio cronico avviato da meccanismi immunitari che interagiscono con fattori di rischio metabolici provocando lesioni vascolari<sup>46</sup>.

La trombosi arteriosa è una complicanza acuta che si sviluppa per la rottura della superficie della placca ateromastica o per erosione endoteliale, causando infarto miocardico o ictus ischemico. Le piastrine rappresentano la “chiave di volta”

cellulare che partecipa alla formazione del trombo occludente l'arteria - mediante proteine recettoriali e molecole di adesione - o che favorisce la rottura della placca, attraverso un processo che si auto mantiene<sup>47</sup>.

I farmaci antiplastrinici – e in modo particolare le basse dosi di aspirina – interferiscono con l'attivazione di enzimi piastrinici e recettori di membrana endoteliale, inibendo la formazione di trombi arteriosi. L'aspirina a basse dosi (75 - 100 mg/die) inibisce in modo permanente l'enzima COX-1 (ciclossigenasi-1), mentre a dosi più elevate (300 mg) inibisce l'enzima COX – 2 (ciclossigenasi-2)<sup>48</sup>. Gli effetti dell'inibizione della COX-1 si possono valutare misurando il trombossano B<sub>2</sub> (TBX2) sierico e i suoi metaboliti urinari<sup>49,50</sup>.

Alla luce di tali osservazioni, ormai da molti anni, la prevenzione della trombosi e della retrombosi nei pazienti a rischio si attua con l'uso di aspirina a basse dosi e le linee guida mondiali, ed in particolare l'American Heart Association, indicano espressamente l'utilità e la sicurezza dell'aspirina a basse dosi in prevenzione primaria per i pazienti al elevato rischio cardiovascolare ed in prevenzione secondaria per coloro che hanno già patito un evento trombotico arterioso<sup>51</sup>.

Tuttavia, una percentuale non irrilevante di individui sviluppano complicanze trombotiche arteriose, malgrado l'uso di aspirina (“aspirin-non-responders”). Il termine invece “Aspirin Resistance” è stato coniato per spiegare l'incapacità dell'aspirina di inibire l'aggregazione piastrinica, la produzione di trombossano e quindi di proteggere i pazienti dalla trombosi con una riduzione media di eventi vascolari non fatali pari al 25-30% (infarto miocardico non fatale 34%, ictus ischemico non fatale 25%)<sup>47,52</sup>.

Probabilmente alla base della resistenza, clinica o funzionale all'aspirina, vi sono dei fattori di variabilità interindividuale non ancora chiariti e che sovrintendono gli effetti dell'aspirina<sup>21,53</sup> tra cui l'interazione farmacodinamica con gli inibitori

reversibili della COX-1<sup>57</sup> e la produzione extrapiastrinica di Trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)<sup>54,55</sup>.

Infatti numerose metanalisi evidenziano che in prevenzione primaria permane una quota di pazienti pari a circa il 30% che presenta il fenomeno della “Resistenza Clinica all’Aspirina”<sup>56,57</sup>. Per spiegare tale osservazione si è chiamata in causa la mancata compliance alla terapia<sup>58</sup> o la presenza di polimorfismi a carico dei geni che codificano gli enzimi COX-1 e COX-2<sup>59</sup>.

Anche nei pazienti con MPNs in trattamento antiaggregante si verifica una quota di eventi trombotici ricorrenti (dopo un primo episodio) pari a circa il 22%<sup>60</sup>, nonostante la terapia antiplastrinica.

Un recente studio italiano<sup>60</sup> ha documentato che nei pazienti affetti da ET in terapia con aspirina, si verifica un aumento della produzione piastrinica di COX-2 che contribuisce ad incrementare la quantità di Trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), anche se le basi di questo meccanismo biochimico non sono ancora del tutto chiare. Lo stesso epifenomeno si osserva peraltro dopo trapianto allogenico di cellule staminali o in tutti i casi di “up regulation” della megacariopoiesi e della produzione di piastrine reticolate<sup>61</sup>.

Al momento, informazioni sull’entità del problema della non-responsività all’aspirina nei pazienti affetti da MPN non sono disponibili.

## LO SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l’efficacia clinica della terapia con aspirina a basse dosi in pazienti con MPNs, nonché di verificare se la resistenza clinica all’aspirina si verifica anche in questo gruppo di pazienti mettendo poi in relazione gli eventi trombotici osservati con lo stato mutazione di JAK2.

## **PAZIENTI E METODI**

Il nostro è uno studio retrospettivo di coorte, condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Abbiamo raccolto tutti i pazienti consecutivi affetti da Policitemia Vera (PV) e Trombocitemia Essenziale (ET), diagnosticate in accordo con i criteri del Polycythemia Vera Study Group (PVSG) e i criteri della World Health Organization (WHO) a seconda del momento storico in cui si è posta la diagnosi. I pazienti afferivano alla U.O.C. di Medicina Interna CLOPD, Azienda Ospedaliera – Università di Padova, e alla U.O.C. di Ematologia, Ospedale Ca' Foncello, Treviso. Per tutti i nostri pazienti era disponibile lo stato mutazionale di JAK2 e tutti assumevano aspirina a basse dosi (100 mg/die). Tale trattamento era stato avviato in 46 pazienti per un evento trombotico arterioso (19 infarti miocardici acuti - IMA, 7 ictus cerebrali, 13 attacchi ischemici transitori - TIA, 4 trombosi arteriose periferiche - PAT, 3 arteriopatie obliteranti degli arti inferiori - PAD) occorso prima della diagnosi (31 pazienti) o alla diagnosi di MPN (15 pazienti); in 210 casi perché affetti da PV (ECLAP), in 108 perché affetti da ET high risk per complicanze trombotiche (>60 anni e/o precedente evento trombotico) ed in 76 pazienti per la presenza di un elevato rischio cardiovascolare il trattamento antiaggregante era stato iniziato prima della diagnosi di MPNs (Tab 3).



I pazienti con PV sono stati trattati con salassi per mantenere un Ht <45% e con idrossiurea (HU) così come le ET high risk con target terapeutico per le piastrine < 600x10<sup>9</sup>/L e per i leucociti < 11x10<sup>9</sup>/L.

Lo studio comprende 440 pazienti di cui 210 pazienti erano affetti da PV (125 maschi, 85 femmine) e 230 da ET (73 maschi, 157 femmine). L'età media alla diagnosi era di 55 ± 16,5 anni (range 18 - 88 anni). La durata mediana del follow up era di 6 anni (Tab 3).

Sono stati registrati i valori emocromocitometrici dei pazienti alla diagnosi, la presenza di splenomegalia in base alla valutazione ecografica del diametro cranio-caudale, i fattori di rischio cardiovascolare (obesità, fumo, ipertensione, diabete, dislipidemie) e sulla base della presenza di tali fattori i nostri pazienti sono anche stati divisi in 2 sottogruppi e cioè in coloro che non avevano fattori di rischio o ne avevano un solo (gruppo A) e in coloro che ne avevano 2 o più (gruppo B) (Tab 6).

Sono stati registrati tutti gli eventi trombotici sia arteriosi che venosi "maggiori": ictus ischemico, attacchi ischemici transitori (TIA), infarto miocardico acuto (IMA), trombosi arteriosa periferica (PAT) e tromboembolismo venoso (VTE) con o senza embolia polmonare.

Non abbiamo registrato eventi emorragici.

La mutazione V617F del gene JAK2 è stata riscontrata in 163 pazienti affetti da PV (87,62%) ed in 137 pazienti affetti da ET (59,56%).

### Materiali e Metodi

Per la ricerca della mutazione è stato estratto DNA genomico isolato da granulociti tramite separazione per gradiente (Ficoll/Histopaque, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), l'estrazione del DNA è stata effettuata con metodica semiautomatica mediante MAXwell 16 instrument (Promega Co, Madison, WI, USA). Con il

materiale ottenuto è stata eseguita una PCR allele specifica, in cui si procede all'amplificazione del frammento di DNA contenente la variazione in esame utilizzando un primer specifico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) per la base che caratterizza tale mutazione. Successivamente il prodotto di PCR viene controllato su gel di agarosio 1,5%. Infine lettura dei campioni con Transilluminatore Biorad Gel Doc (Biorad, Hercules, CA, USA); e Software Quantità One Biorad versione 4.6.3 (Biorad, Hercules, CA, USA) (Fig 3.).

### Analisi Statistica

Per il confronto diretto delle proporzioni tra le variabili quantitative/qualitative, abbiamo utilizzato il test esatto di Fisher o il test Chi-quadrato stabilendo come criteri una distribuzione a due code con un grado di errore (alfa) minore di 0,05 (5%). Per valutare la relazione tra gli eventi trombotici ed i principali fattori di rischio abbiamo eseguito uno studio con analisi multivariata (Logistic Regression), mantenendo sempre la significatività statistica con  $p < 0,05$ . Per tutte le operazioni descritte abbiamo utilizzato il software SPSS, ultima versione disponibile.



## RISULTATI

La mutazione V617FJAK2 è stata riscontrata in 163 pazienti affetti da PV (85,62%) ed in 137 pazienti affetti da ET (59,56%), mentre 47 PV e 93 ET erano WT. In Tabella 3 sono registrate le principali caratteristiche osservate nei nostri pazienti in base allo stato mutazione di JAK2.

### ANALISI UNIVARIATA

Tra i nostri 440 pazienti, 147 (33,4%; 80 PV e 67 ET) hanno avuto almeno un evento trombotico: 80 PV (36%) e 67 ET (29%). I pazienti con PV hanno dunque presentato una significativa maggiore frequenza di complicanze cardiovascolari ( $p = 0.046$ ).

La prevalenza di mutazione V617FJAK2 era significativamente maggiore tra coloro che sviluppavano trombosi (116 pazienti contro 31 WT) ( $p = 0,0003$ ) (Fig 5). Tra i pazienti con PV, le complicanze trombotiche sono state osservate in 70 (42,9%) mutati ed in 10 (21,2%) WT ( $p = 0.0001$ ) mentre tra quelli con ET le complicanze trombotiche si sono sviluppate in 46 (33,5%) V617FJAK2 e 21 (22,5%) WT ( $p = NS$ ) (Fig 4, Tab 5).

La conta leucocitaria media era di  $12,2 \pm 10,0 \times 10^9/L$  tra i PV con mutazione JAK2V617F, di  $7,7 \pm 2,4 \times 10^9/L$  tra i WT; tra i pazienti con ET la conta leucocitaria è risultata di  $10,0 \pm 3,4 \times 10^9/L$  tra i mutati e  $7,9 \pm 2,7 \times 10^9/L$  tra i WT. Tali differenze non sono peraltro risultate significative. Non sono state dimostrate differenze tra i valori medi di leucociti alla diagnosi nel campione di pazienti con

eventi trombotici rispetto a quello senza eventi: tali medie sono risultate rispettivamente di  $10,0 \pm 4,5 \times 10^9/L$  e  $9,1 \pm 6,0 \times 10^9/L$  ( $p = 0,156$ ) (Fig 6).

La media del valore delle piastrine è risultata pari a  $524 \pm 292 \times 10^9/L$  e  $260 \pm 113 \times 10^9/L$  nei pazienti affetti da PV, rispettivamente con mutazione della JAK2 e WT, mentre negli affetti da ET era rispettivamente di  $740 \pm 250 \times 10^9/L$  nei mutati e  $741 \pm 286 \times 10^9/L$  nei WT. Le piastrine dei pazienti con ET erano dunque mediamente più elevate ( $p < 0,0001$ ) di quelle dei pazienti con PV ma non vi era differenza statistica tra quelle dei pazienti V617FJAK2 e WT. Tra gli affetti da PV, la media delle piastrine nei pazienti mutati è risultata significativamente maggiore rispetto a quelli WT. Non sono state dimostrate differenze tra i valori medi di piastrine nel campione di pazienti con eventi trombotici rispetto a quello senza eventi: tali medie sono risultate rispettivamente di  $585,63 \pm 255,5 \times 10^9/L$  e  $573,36 \pm 354,4 \times 10^9/L$

( $p = 0,7$  NS) (Fig 6.1).

Considerando i fattori di rischio cardiovascolare, nel gruppo A erano compresi 158 PV (130 V617FJAK2 e 28 WT) e 184 ET (99 V617FJAK2 e 85 WT), nel gruppo B 52 PV (33 V617FJAK2 e 19 WT) e 46 ET (38 V617FJAK2 e 8 WT). Quando abbiamo diviso i pazienti in base alla presenza di fattori di rischio cardiovascolare, il sottogruppo con meno fattori di rischio è risultato sviluppare minor numero di eventi trombotici ( $p = 0,037$ ) ai limiti della significatività statistica (Tab 6).

## **ANALISI MULTIVARIATA**

L'analisi multivariata ha dimostrato che gli eventi trombotici si manifestano prevalentemente in presenza della mutazione V617FJAK2, indipendentemente dalla leucocitosi maggiore o minore di  $10,0 \times 10^9/L$ , dall'età sopra o sotto i 60 anni e dalla presenza dei fattori di rischio cardiovascolare o di precedente complicanza trombotica. (Tab 7/ Fig 7).

## **DISCUSSIONE**

L'aspirina a basse dosi è utilizzata comunemente nella pratica clinica per la prevenzione della trombosi nei pazienti a rischio e per la prevenzione della re-trombosi in coloro che hanno già in precedenza sviluppato eventi trombo-embolici<sup>56,57</sup>.

E' tuttavia esperienza comune che una certa quota di soggetti risultino non-responsivi all'azione dell'aspirina. Vari studi hanno cercato di dimostrare quale sia il motivo della mancata risposta di questi individui. Diversi Autori<sup>53</sup> hanno ipotizzato che dipenda da una cattiva compliance dei pazienti, altri<sup>54,55</sup> invece che vi siano polimorfismi delle proteine intestinali che modificano l'assorbimento dell'acido acetilsalicilico.

Ciò che si è potuto comunque fino ad oggi dimostrare è che effettivamente esistono dei soggetti nei quali, malgrado l'assunzione di aspirina, non si ottiene un' adeguato blocco dell' aggregazione piastrinica *in vitro* sotto stimolo di acido arachidonico e non si raggiunge mai una completa soppressione della produzione di Trombossano (TBX2)<sup>16, 62</sup>.

L'efficacia e la sicurezza dell'uso di aspirina a basse dosi nei pazienti con PV, è stato ampiamente validato dallo studio ECLAP<sup>40</sup> anche se già in precedenza vi erano evidenze che l'inibizione del TBX2 poteva avvenire con soli 100 mg/die di aspirina in pazienti con un elevato numero di piastrine<sup>51, 52</sup>.

Il nostro studio si è proposto di osservare l'incidenza degli eventi trombotici in pazienti affetti da disordini mieloproliferativi cronici (PV ed ET) che assumevano terapia con aspirina a basse dosi, al fine di chiarire se anche in questi pazienti MPNs esiste una "non-responsività" all'agente antiaggregante in termini clinici.

Inoltre, in considerazione dell'importanza che oggi riveste il riconoscimento della mutazione JAK2V167F<sup>8,9,10,11,12</sup> in queste malattie, ci siamo chiesti se l'eventuale mancata risposta all'aspirina sia in qualche modo correlata allo stato mutazionale



di questi malati. Precisiamo che la percentuale di nostri pazienti portatori di mutazione è stata sia per quelli con PV (87,62%) che con ET (59,56%) simile a quanto segnalato dalla letteratura.

Nel nostro lavoro abbiamo riscontrato che i pazienti con MPNs in terapia con basse dosi di aspirina hanno eventi trombotici in ragione di circa il 35% nelle PV e del 30% nelle ET. Pertanto, anche tra i pazienti con MPNs risultano esserci casi di non-responsività all'aspirina a basse dosi, in una percentuale di soggetti assai simile a quella degli individui non affetti da MPNs, valutata del 25-30% nelle varie casistiche<sup>59,67</sup>.

E' noto che il rischio trombotico sia maggiore nelle PV<sup>13,14,28</sup> rispetto alle ET<sup>64</sup> così come abbiamo osservato anche noi, poiché in corso di policitemia vera intervengono molteplici aspetti oltre all'isolato incremento della conta piastrinica, quali l'incremento della viscosità ematica e l'elevata massa eritrocitaria<sup>66</sup>. Tali fattori favoriscono la stasi ematica e certamente contribuiscono attivamente alle trombosi. Comunque, su tale aspetto pesa anche il fatto che virtualmente tutti i malati con PV siano portatori di una mutazione di JAK2 e, se è vero che le ET mutate hanno più eventi trombotici<sup>35</sup>, non sorprende pensare che i pazienti affetti da PV corrano un rischio trombotico maggiore di quelli con ET.

Nella nostra coorte di pazienti, in accordo con la letteratura<sup>15</sup>, i soggetti con ET si dividono circa a metà per quanto riguarda lo stato mutazionale ma la presenza di V617FJAK2 appare non correlata con il rischio delle complicanze cardio-vascolari in corso di trattamento antiaggregante. Al contrario, le rare PV non mutate hanno meno complicanze trombotiche dei pazienti positivi per V617FJAK2. Riteniamo che tale osservazione suggerisca che le "PV" non mutate siano in realtà eritrocitosi di altra natura che al momento non sappiamo meglio definire. Molti Autori<sup>63,64</sup> hanno osservato come la presenza di mutazione JAK2 nelle ET sembri associarsi con maggior rischio trombotico.

I nostri dati invece, non confermano tale osservazione, ma ciò potrebbe essere giustificato dall'ipotesi che l'aspirina sia particolarmente efficace come prevenzione nei casi di ET mutata.

Dato che è stata osservata una elevata incidenza di trombosi<sup>25,26,27</sup> soprattutto arteriose<sup>27,36</sup> nei pazienti con PV o ET e livelli elevati di leucociti alla diagnosi, benchè non vi sia accordo tra i diversi autori<sup>45</sup>, anche noi abbiamo voluto valutare il peso del numero dei WBC nei soggetti con MPNs in terapia con aspirina. Nella nostra casistica non sembra che il valore dei leucociti alla diagnosi abbia un significato pro-trombotico, neppure mettendo in relazione il numero dei leucociti con la mutazione V617FJAK2. I nostri dati, pertanto, sembrano non confermare la relazione trombosi/leucocitosi/mutazione di JAK2<sup>38</sup>, già messa in dubbio da Gangat<sup>45</sup>, almeno nei pazienti MPNs in terapia con aspirina.

Il ruolo dei fattori di rischio cardiovascolare nella genesi della trombosi nelle MPNs è da molti anni dibattuto. Alcuni Autori<sup>25,31,68</sup> hanno suggerito che in particolare il fumo di sigaretta possa influire favorendo l'insorgenza delle complicanze trombotiche nelle MPNs come d'altra parte nella popolazione generale<sup>32,33</sup>. Effettivamente, nella nostra coorte di MPNs in terapia con ASA, il sottogruppo di pazienti privi di fattori di rischio o con uno solo di essi è risultato sviluppare minor numero di eventi trombotici seppure con una significatività ai limiti. Pertanto l'aspirina a basse dosi sembra più efficace nel prevenire le trombosi se i rischi aterosclerotici sono minori.

Infine, per escludere che i vari fattori di rischio trombotico documentati o sospetti influiscano nella valutazione dell'importanza dello stato mutazionale, abbiamo comparato la conta leucocitaria, l'età, la storia positiva per una precedente complicanza trombotica e la presenza di fattori di rischio cardiovascolare con l'occorrenza di complicanze trombotiche nei nostri pazienti. A conferma della importanza della mutazione nel riguardo del rischio trombotico l'analisi

multivariata da noi eseguita ha mostrato come la mutazione sia un fattore di rischio indipendente da altre condizioni implicate come fattori di rischio in queste patologie.

I nostri dati sembrano suggerire che, così come nella popolazione generale, esista una non-responsività all'aspirina almeno in una parte dei pazienti con MPNs. Tale fenomeno appare più rilevante nei pazienti con la mutazione V617FJAK2. Si potrebbe quindi ipotizzare che non tutti i casi di MPNs possano trovare giovamento da una terapia antiaggregante piastrinica a bassi dosaggi di ASA, oppure che, come si è pensato in altri gruppi di pazienti, ci possa essere una inadeguata compliance dei malati al trattamento o un malassorbimento del farmaco.

Riteniamo peraltro che il problema non possa essere ignorato e meriti adeguati approfondimenti. Il nostro studio sta già procedendo con la valutazione in questi soggetti della funzionalità piastrinica con test di aggregazione, di produzione del trombossano (TBX2) per tentare di chiarire così quale sia l'entità e la fisiopatologia del problema.

# **Tabelle e Figure**

**Tab 1.** Sistema Scoring dei fattori di rischio

<b>Fattori di Rischio</b>	<b>Score</b>
Età < 40 anni	0
40 – 55	1
56 – 65	2.5
> 65	3.5
Ipertensione	0.5
Dislipidemia	0.5
Conta piastrinica (> 1000 x 10 <sup>9</sup> /L)	1
Conta leucocitaria (> 11 x 10 <sup>9</sup> /L)	1
Tabagismo	1.5
Diabete	1.5
Pregresse trombosi	3.5

Landolfi R. Hematologica 2008;



**Tab 2.** Stratificazione del rischio e opzioni terapeutiche in Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale

<b>Score</b>	<b>Grado di rischio</b>	<i>Trattamento suggerito</i>		<b>AR*</b>
		<i>Policitemia Vera</i>	<i>Trombocitemia Essenziale</i>	
<1	<b>Basso</b>	Salasso Considerare l'aspirina	Considerare l'aspirina	<1.5
1-3	<b>Medio</b>	Salasso Aspirina	Aspirina Considerare Idrossiurea o IFN	1.5-3
3.1-5.5	<b>Alto</b>	Aspirina Idrossiurea	Aspirina Idrossiurea	3.1-6
>5	<b>Molto alto</b>	Aspirina Idrossiurea Considerare trattamenti più aggressivi	Aspirina Idrossiurea Considerare trattamenti più aggressivi	>6

\*AR: rischio assoluto approssimato (%pazienti/anno) (22,23,24)

**Tab 3.** Principali caratteristiche dei nostri pazienti in base alla MPN e allo stato mutazionale.

	POLICITEMIA VERA		TROMBOCITEMIA ESSENZIALE	
	JAK2 POSITIVI n° 163	JAK2 NEGATIVI n° 47	JAK2 POSITIVI n° 137	JAK2 NEGATIVI n° 93
<b>Sesso (M/F)</b>	84M/79F	41M/6F	50M/86F	25M/71F
<b>Follow up mediano (anni)</b>	6	2	6	6
<b>Età (anni)</b>	57,9 ± 15,0	52,4 ± 15,6	55,4 ± 18,0	51,6 ± 17,9
<b>WBC (10<sup>9</sup>/l)</b>	10,6 ± 6,5	7,6 ± 4,0	9,3 ± 3,2	8,5 ± 3,7
<b>Hb (g/dl)</b>	16,5 ± 6,5	16,8 ± 1,3	14,1 ± 3,6	13,6 ± 1,9
<b>Ht (%)</b>	49,9 ± 7,2	50,9 ± 3,3	44,6 ± 6,3	43,3 ± 4,9
<b>Plts (10<sup>9</sup>/l)</b>	580,8 ± 365,7	285 ± 141,7	745 ± 210	764 ± 333
<b>Splenomegalia* (n° pz)</b>	101 (61%)	19 (40%)	70 (51%)	40 (43%)
<b>Anomalie cariotipo**</b>	5/(104N)	0/(23N)	2/(82N)	2/(45N)



*\*La splenomegalia è stata considerata in presenza di un diametro cranio-caudale  $\geq 12$  cm allo studio ecografico.*

*\*\*Il cariotipo era disponibile per su 263 pazienti; N = cariotipo normale.*

**Tab 4.** Relazione tra stato mutazionale di JAK2 e conta leucocitaria, conta piastrinica e splenomegalia.

\*Milza di dimensioni ↑ Aumentate o N Normali

	PV			ET		
	V617F	WT	<i>P</i>	V617F	WT	<i>p</i>
<i>Pazienti</i>	<b>163</b>	47		<b>137</b>	93	
<b>WBC x 10<sup>9</sup>/L</b>	12,245 ± 7,247	7,631 ± 2,400	<b>0,005</b>	10,051 ± 3,488	7,898 ± 2,726	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Plts x 10<sup>9</sup>/L</b>	524 ± 292	260 ± 113	<b>&lt;0,0001</b>	740 ± 250	741 ± 286	NS
<b>Milza ↑ /N*</b>	101/62	19/28	<b>0,01</b>	70/67	40/53	NS

**Tab 5.** Complicanze trombotiche nei pazienti con MPN in corso di terapia con Aspirina 100 mg/die.

	POLICITEMIA VERA			TROMBOCITEMIA ESSENZIALE		
	JAK2V617F	JAK2 WT	<i>p</i>	V617FJAK2	JAK2 WT	<i>p</i>
<b>NO TROMBOSI</b>	93 (57%)	37 (78,7%)	<b>0.0001</b>	91 (66,4%)	72 (77,4%)	NS
<b>TROMBOSI</b>	70 (42.9%)	10 (21.2%)		46 (33.5%)	21 (22.5%)	

**Tab 6.** Relazione tra esposizione a fattori di rischio cardiovascolare e trombosi  
**Gruppo A** = pazienti con 1 o nessun fattore di rischio.  
**Gruppo B** = pazienti con 2 o più fattori di rischio.

<b>FATTORI di RISCHIO cardiovascolare</b>	<b>Trombosi</b>	<b>No Trombosi</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Gruppo A.</b> 158 PV/ 184 ET	<b>108 (31,6%)</b>	<b>234</b>	<b>0,037</b>
<b>Gruppo B.</b> 52 PV/ 46 ET	<b>42 (42,86%)</b>	<b>56</b>	

Tab 7. **Analisi multivariata** (Regressione Logistica)

	TROMBOSI	NO TROMBOSI	ANALISI MULTIVARIATA	
Variabili	N°	N°	Rischio Relativo (95% CI)	p*
<b>WBC</b>				
< 10,000	62	148	1	
≥ 10,000	88	142	2,33 (da 0,80 a 6,56)	NS**
<b>Età</b>				
< 60 anni	72	152	1	
≥ 60 anni	78	138	1,85 (da 0,72 a 5,33)	NS
<b>Risk Factor CV</b>				
Gr A (0 - 1)	108	234	1	
Gr B (2 o +)	42	56	1,62 (da 0,84 a 4,45)	NS
<b>Trombosi</b>				
Assente	100	244	1	
Presente	50	46	2,8 (da 0,95 a 5,10)	NS
<b>V617FJAK2</b>				
Assente	31	109	1	
Presente	119	181	9,33 (da 1,23 a 86,12)	0,029

\*Gli eventi trombotici includono trombosi arteriose, venose alla diagnosi e durante e il follow up.

\*\*NS = non significativo

**Fig 1.** Rappresentazione grafica della mutazione V617FJAK2  
(Goldman NEJM 2005)

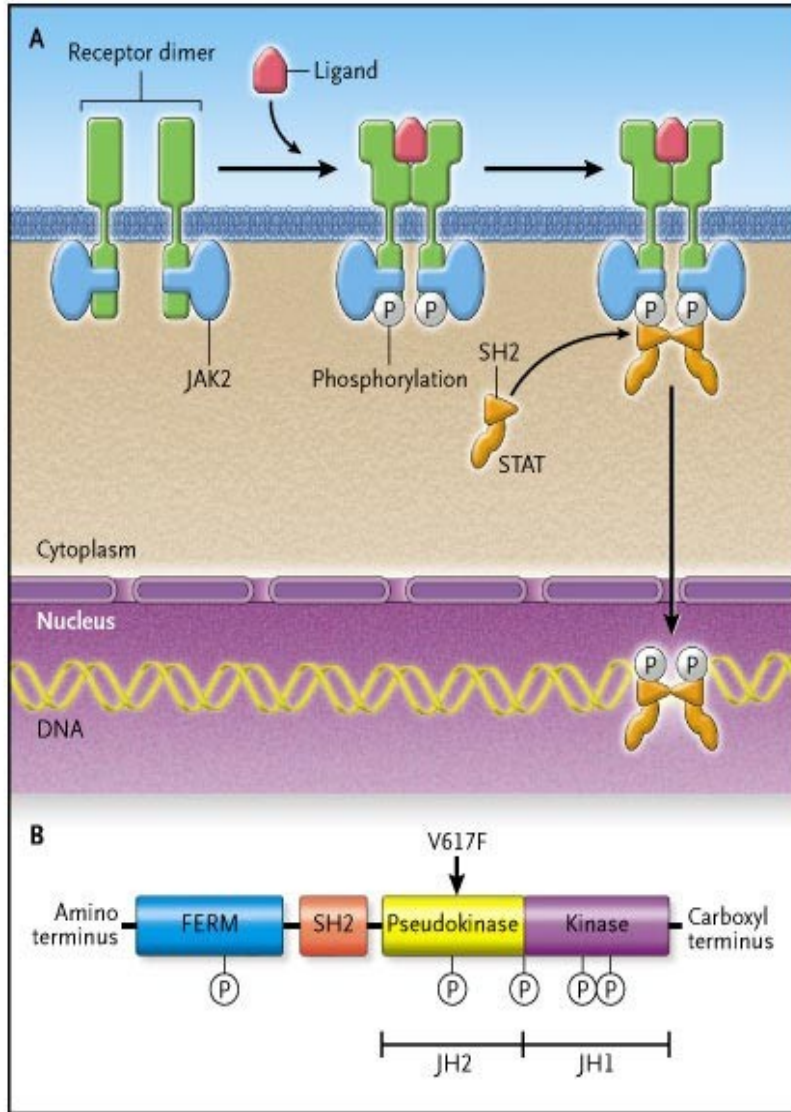
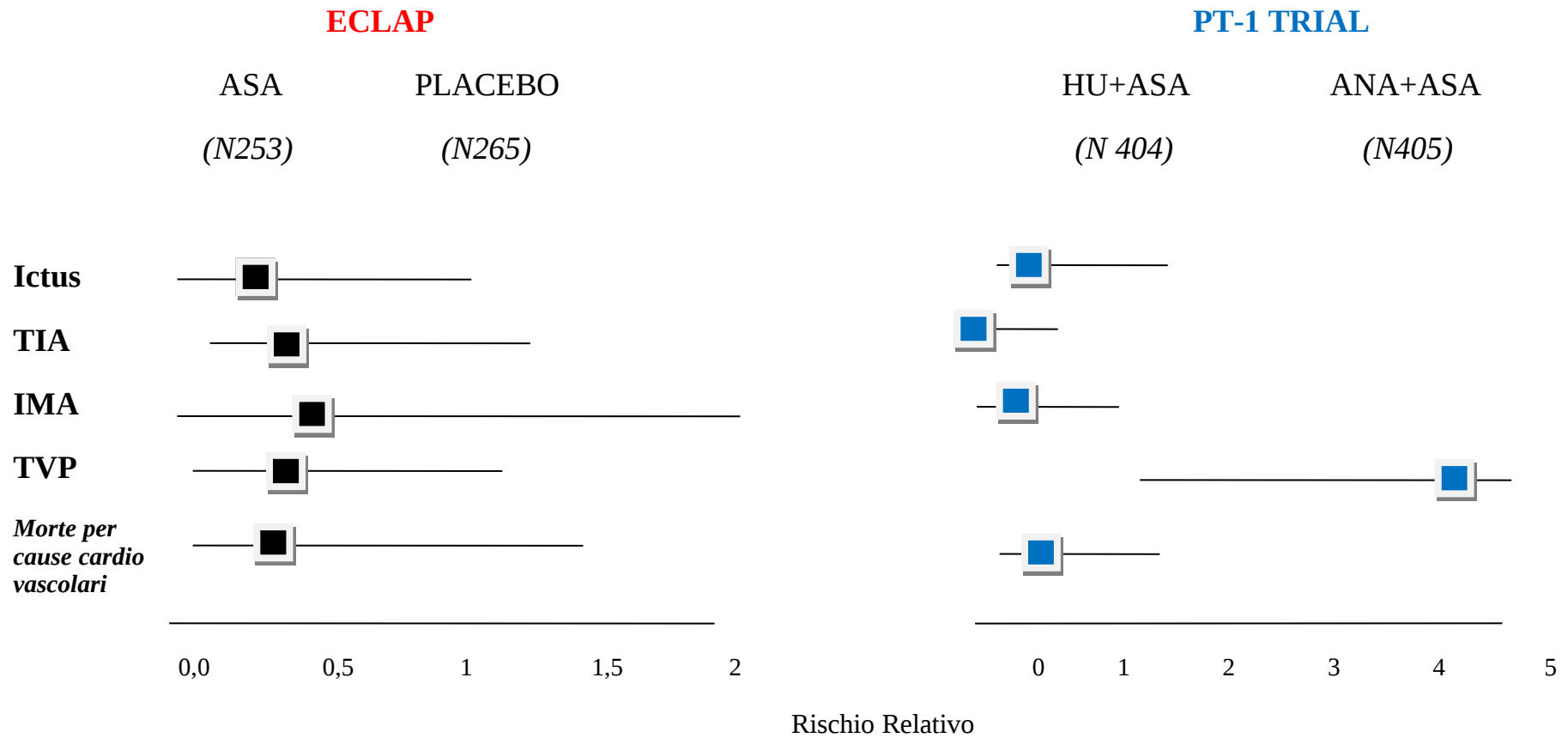




Fig 2.

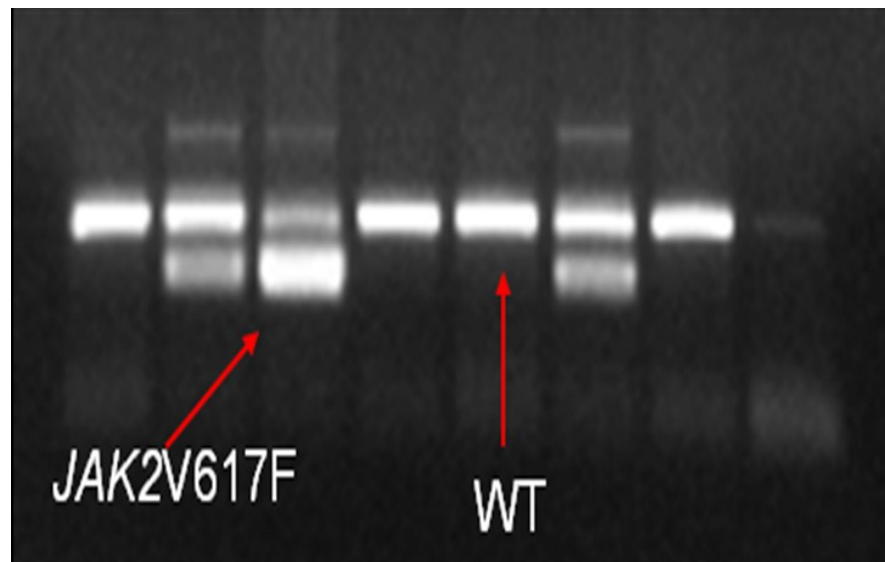


Intervalli di confidenza dei rischi relativi per diversi eventi cardiovascolari nei pazienti randomizzati dallo studio ECLAP e PT-1.

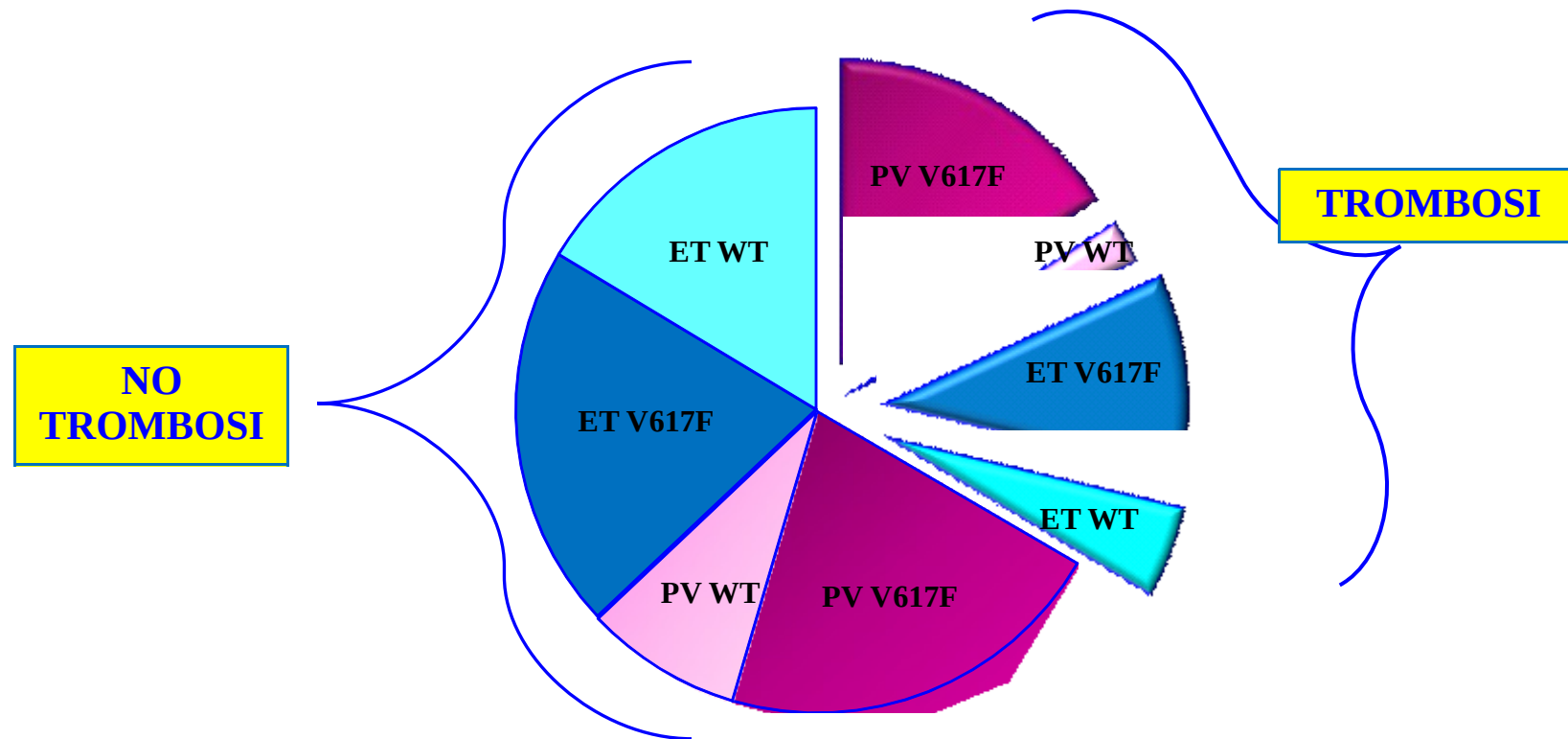
(Harrison CN et al N Engl J Med 2005)

**Fig. 3** Mutazione V617FJAK2: PCR allele- Specifica su gel di Agarosio

**PCR ALLELE-SPECIFICA**



**Fig 4.** Trombosi in relazione alla diagnosi di MPN e allo stato mutazionale di JAK2.



**Fig 5.** Trombosi arteriose nei nostri pazienti con MPN occorse malgrado la terapia con ASA .

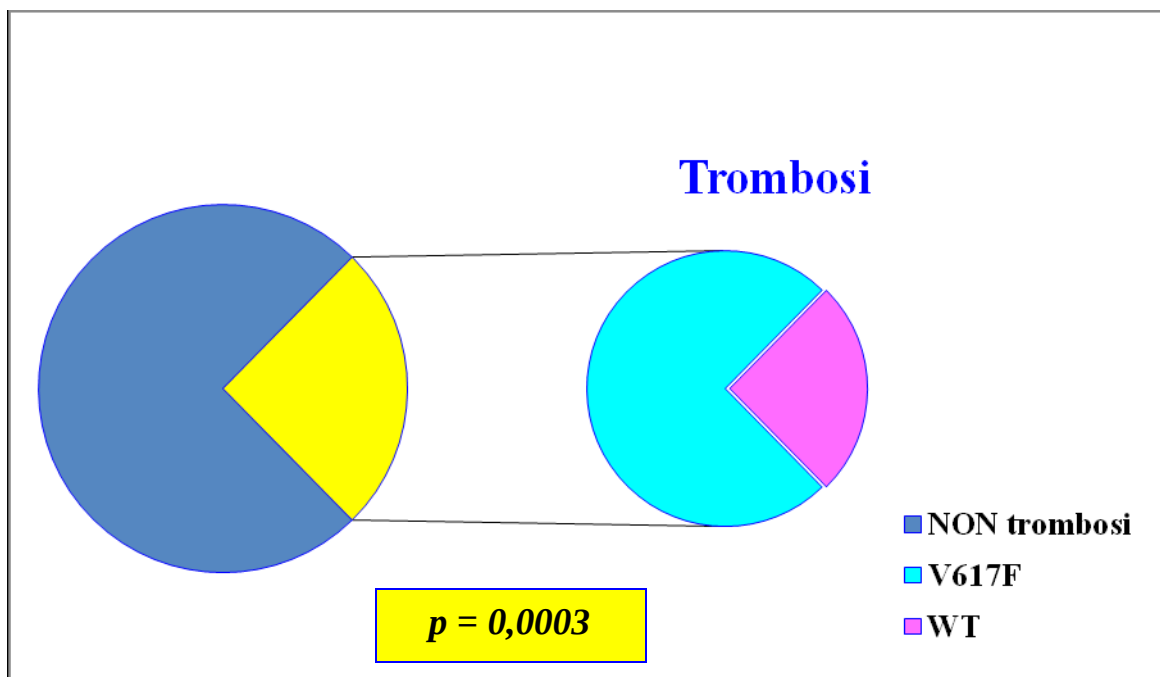
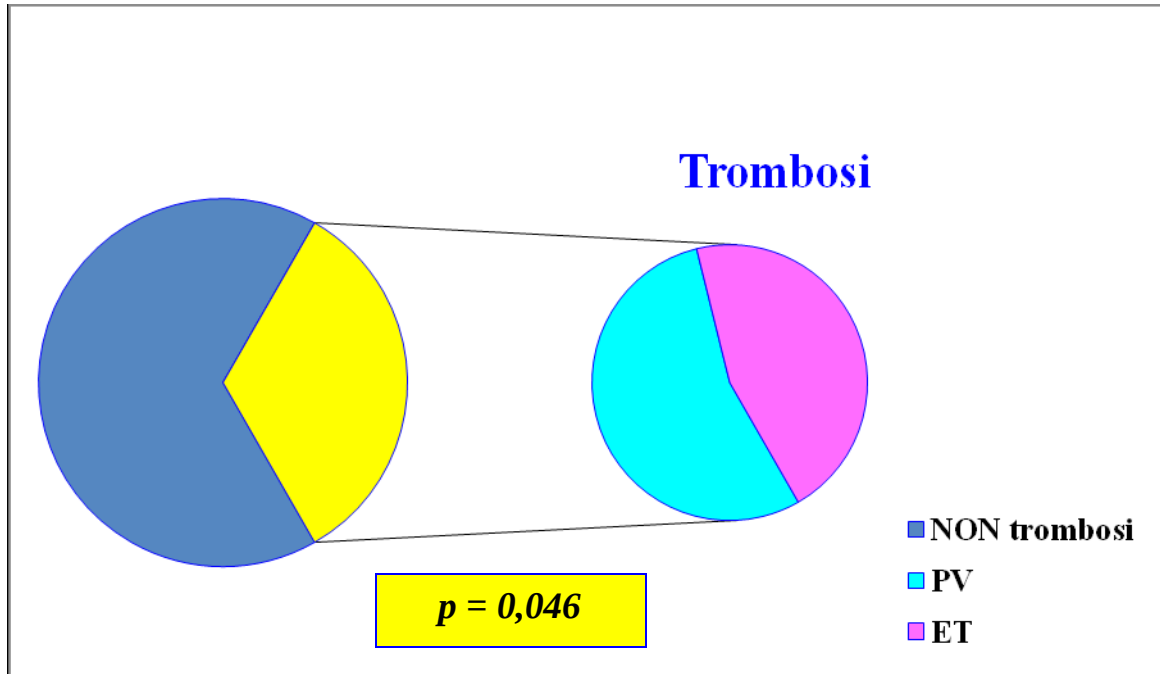


Fig 6. Relazione tra la media della conta Leucocitaria e la Trombosi

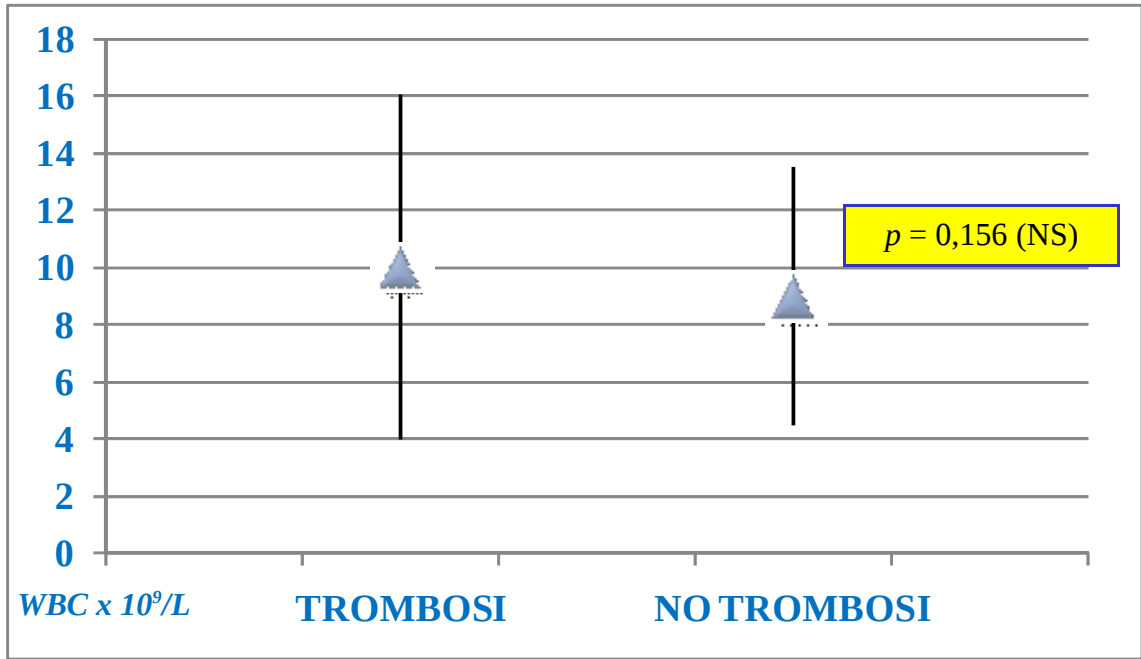
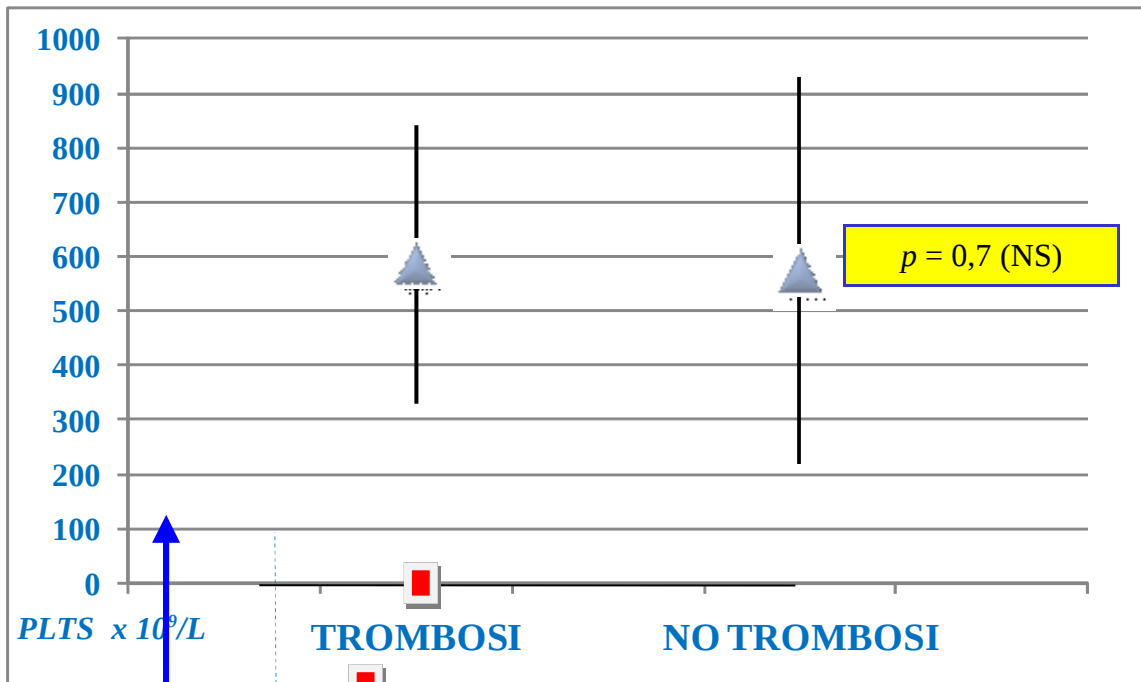
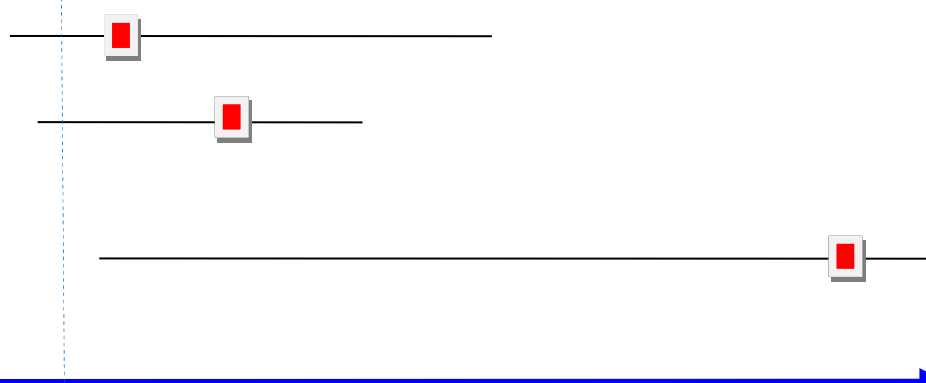


Fig 6.1 Relazione tra la media della conta Piastrinica e la Trombosi



Variabili



**WBC**

**Età**

**Risk Factor**

**Trombosi**

**Pregresse**

**JAK2+**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

**Rischio Relativo**

**Fig 7.** Analisi multivariata delle caratteristiche potenzialmente utili per la valutazione del rischio trombotico. Solo per la presenza di V617F JAK2 si è ottenuta una  $p = 0.02$  (statisticamente significativa).

La presenza di mutazione risulta come fattore indipendente di rischio trombotico.



## BIBLIOGRAFIA

1. Barosi G., Mesa RA., Thiele J., Cervantes F., Campbell PJ., Verstovsek S., Dupriez B., Levine RL., Passamonti F., Gotlib J., Reilly JT., Vannucchi AM., Hanson CA., Solberg LA., Orazi A., Tefferi A. *Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment.* Leukemia 2008; 22: 437-438.
2. Vannucchi AM., Guglielmelli P. *Molecular pathophysiology of Philadelphia negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations.* Hematologica 2008; 93: 972-976.
3. Vaquez H. *Sur une forme special de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante.* C R Soc Biol (Paris) 1892; 44: 384-8.
4. Dameshek W. *Some speculations on the myeloproliferative syndromes.* Blood 1951; 6: 372-5.
5. Epstein E. Goedel A. *Hemorrhagic thrombocythemia with vascular, sclerotic spleen.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1934; 293: 233-248.
6. Dupont S., Masse A., James C. *The Jak2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cell from patients with polycythemia vera.* Blood 2007; 110: 1013-1021.
7. Fialkow PJ., Fogent GB., Jacobson RT., Murphy S. *Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell.* Blood 1981;58(5)
8. James C., Ugo V., Couedic JP., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C., Garcon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval JL., Constantinescu SN., Casadevall N., Vainchenker W. *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera.* Nature 2005; 434: 1144-1148.
9. Baxter EJ., Scott LM., Campbell PJ. *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases.* Lancet 2005; 365: 1054-1061.
10. Kralovics R., Passamonti F., Buser AS., Buser AS., Teo SS., Tiedt R., Passweg JR, Tichelli A., Cazzola M., Skoda RC. *A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.* N Engl J Med 2005; 352: 1779-1790.
11. Zhao R., Xing S., Li Z., *Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera.* J Biol Chem 2005; 280: 22788-22792.



12. Levine RL., Wadleigh M., Cools J., Ebert BL., Wernig G., Huntly BJ., Boggon TJ., Wlodarska I., Clark JJ., Moore S., Adelsperger J., Koo S., Lee JC., Gabriel S., Mercher T., D'Andrea A., Frohling S., Dohner K., Marynen P., Vandenberghe P., Mesa RA., Tefferi A., Griffin JD., Eck MJ., Sellers WR., Meyerson M., Golub TR., Lee SJ., Gilliland DG. *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and Myeloid Metaplasia with myelofibrosis*. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
13. Vannucchi A.M. *Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia*. *Intern Emerg Med* 2009.
14. Marchiori R., Finazzi G., Landolfi R., Kutti J., Gisslinger H., Patrono C., Marilus R., Villegas A., Tognoni G., Barbui T. *Vascular and neoplastic risk in large cohort of patients with polycythemia vera*. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2224-2232.
15. Wolanskyj AP., Schwager SM., McClure RF. *Essential Thrombocythemia beyond the first decade; life expectancy, longterm complication rates and prognostic factor*. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 159-166.
16. Jones AV., Cross NC., White HE., Scott ML. *Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis*. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1560-4.
17. Besses C., Cervantes F., Pereira A., Florensa L., Sole F. *Major vascular complication in essential thrombocythemia: a series of 148 patients*. *Leukemia* 1999; 13: 150-4
18. Rodeghiero F., Ruggeri M., Passamonti F. et al. *Reccurent thrombosis in PV and ET*. *Hematologica* 2008; 93(3)373.
19. Elliot MA., Tefferi A. *Thrombosis and haemorrhage in polycythemia vera and essential theombocythemia*. *Br J Haematol* 2005; 128: 275-90.
20. Areliano-Rodrigo E., Alvarez-Larran A., Reverter JC. *Increased platelets and leukocyte activation ascontributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with JAK2 mutational status*. *Haematologica* 2006; 91: 169-175.
21. Cattaneo M. *Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and issue of drug resistance*. *Arteriol Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980-7.
22. Finazzi G. Barbui T. *How I treat patients with polycythemia vera*. *Blood* 2007; 21: 270 – 6.
23. Ziakas PD. *Effect of JAK2V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain*. *Hematologica* 2008; 93: 1412-1414.
24. De Stefano V., Fiorini A., Rossi E., Za T., Farina G., Chiusolo P., Sica S., Leone G. *Incidence of JAK2V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders*. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 708-714.

25. Landolfi R., Di Gennaro L., Barbui T., De Stefano V., Finazzi G., Marfisi R. *Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera*. Blood 2007; 109: 2446-52.
26. Falanga A., Marchetti M., Vignoli A., Balducci D., Barbui T. *Leukocyte platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Exp Hematol 2005; 33: 523-30.
27. Carobbio A., Finazzi G., Guerini V., Spinelli O., Mrachiori R. *Leukocytosis a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia : interaction with treatment, standard risk factor and Jak2 mutation*. Blood 2007; 109: 2310-3.
28. De Stefano V., Za T., Rossi E., Vannucchi AM., Ruggeri M., Elli E., Cacciola RR., Santoro C., Scognamiglio F., Rodeghiero F., Vianelli N., Finazzi G., Gugliotta L., Marchiori R., Barbui T. *Recurrent Thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments*. Hematologica 2008; 93: 372-380.
29. Marchetti M., Falanga A. *Leukocytosis, JAK2V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders*. Pathophysiol Haemost Thromb 2008; 36: 148-159.
30. Tefferi A., Gangat N., Wolanskyj AP. *Management of extreme thrombocytosis in otherwise low risk essential thrombocythemia; does number matter?*. Blood 2006; 108: 2493-2494.
31. Tefferi A., Gangat N., Wolanskyj A. *The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia*. Blood 2007; 109:4105.
32. Lowe GD. *Common risk factors for both arterial and venous thrombosis*. Br J Hematol. 2008; 140: 486-495.
33. Ross R. *Atherosclerosis: an inflammatory disease*. N Engl J Med 1999; 340: 115-126.
34. Tzoulaki I., Murray GD., Lee AJ. *C-reactive protein, interleukin 6 and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in general population*. Edinburgh Artery Study. Circulation 2005; 112: 976-986.
35. Harrison CN., Campbell PJ., Puck G., Wheatley K., East CL., Bareford D., Wilkins BS., van der Walt DJ., Reilly JT., Grigg AP., Revell P., Woodcock BE., Green AR. *Hydroxyurea compared with anagrelide in high risk essential thrombocythemia*. N Engl J Med 2005; 353: 33-45.
36. Carobbio A., Finazzi G., Antonioli E., Guglielmelli P., Vannucchi AM, Delaini F., Guerini V., Ruggeri M., Rodeghiero F., Rambaldi A., Barbui T. *Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia*. Blood 2008; 112(8): 3135-3137.

37. Barbui T., Carobbio A., Rambaldi A., Finazzi G. *Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor?*. Blood 2009; 114: 2493-2494.
38. De Stefano V., Za T., Rossi E., Vannucchi A., Ruggeri M., Elli E., Tieghi A., Scognamiglio F., Santoro C., Rodeghiero F., Finazzi G., Gugliotta L., Barbui T. GIMEMA chronic myeloproliferative neoplasms party. *Leukocytosis is a risk factor for recurrent arterial thrombosis in young patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia*. American J Haematol 2009; 97-99.
39. Landolfi R., Marchiori R., Kutti J., Gisslinger H., Tognoni G., Patrono C., Barbui T. *Efficacy and safety of low dose aspirin in polycythemia vera*. N Engl J Med 2004; 350: 114-124.
40. Berk PD., Goldberg JD., Donovan PB. *Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols*. Semin Hematol 1986; 23: 132-143.
41. Tartaglia AP., Goldberg JD, Berk PD. *Adverse effects of antiaggregating platelets therapy in the treatment of polycythemia vera*. Semin Hematol 1986; 23: 172-176.
42. Fruchtman SM., Mack K, Kaplan ME. *From efficacy to safety: a polycythemia vera study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera*. Semin Hematol 1997; 34: 17.
43. Van Genderen PJJ., Prins F., Michiels JJ. *Thromboxane-dependent platelet activation in vivo precedes arterial thrombosis in thrombocythemia: a rationale for the use of low dose aspirin as an antithrombotic agent*. Br J Hematol 1999; 104: 438-441.
44. Finazzi G., Barbui T. *Risk adapted therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Blood Rev 2005; 19: 243-252.
45. Gangat N., Wolanskyj AP., Schwager S., Hanson CA., Tefferi A. *Leukocytosis at diagnosis and the risk of subsequent thrombosis in patients with low risk essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Cancer 2009; 15: 5740 – 45.
46. Hansson GK. *Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease*. N Engl J Med 2005; 352: 1685-95.
47. Patrono C., Rodriguez MD., Landolfi R., Baigent C. *Low dose of aspirin for the prevention of atherosclerosis*. N Engl J Med 2005; 353: 2373-2382.
48. Roth GJ., Stanford N., Majerus PW., *Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin*. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3073-6.
49. Patrignani P., Filabozzi P., Patrono C. *Selective cumulative inhibition of platelets thromboxane production by low dose of aspirin in healthy subjects*. J Clin Invest 1982;69:1366-72

50. Fitzgerald GA., Oates JA. *Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man.* J Clin Invest 1983;71-88
51. Landolfi R., Ciabattoni G., Patrignani P., Castellana MA., Pogliani E., Bizzi B., Patrono C. *Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin suppressible platelet activation in vivo.* Blood 1992; 80(8): 1965-71.
52. Patrono C. *Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs.* J Thromb Haemat 2003; 1: 1710-3
53. Rocca R., Patrono C. *Determinants of the individual variability in response to antiplatelet drug.* J Thromb Haemost 2005; 8: 1597-1602.
54. Capone ML., Sciulli MG., Tacconelli S. *Pharmacodynamic interaction of naproxen with low dose aspirin in healthy subjects.* J Am Coll Cardiol 2005; 45: 1295-301.
55. Cipollone F., Ciabattoni G., Patrignani P. *Oxidant stress and aspirin in sensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina.* Circulation 2000; 102: 1007-13.
56. Collaborative Group of the Primary Prevention Project, *Low dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomized trial in general practice.* Lancet 2001; 357: 89-95.
57. Sanmuganathan PS., Ghahramani P., Jackson PR., Willis EJ., Ramsay LE. *Aspirin for primary prevention of coronary heart disease: safety and absolute benefit related to coronary risk derived from metanalysis of randomized trials.* Heart 2001; 85: 265-71.
58. Kim C., Beckles GI. *Cardiovascular disease risk reduction in the Behavioral Risk Factor Surveillance system.* Am J Prev Med 2004; 27: 1-7.
59. Censarek P., Freidei K., Udelhoven M. *Cyclooxygenase COX-2°, a novel COX-2 mRNA variant, in platelets from patients after coronary artery by-pass grafting.* Thromb Haemost 2004; 92(5): 925-928.
60. Dragani A., Pascale S., Recchuiti A., Mattoscio D., Lattanzio S., Petrucci G., Mucci L., Ferrante E., Habib A., Ranelletti FO., Ciabattoni G., Davì G., Patrono C., Rocca B. *The contribution of cyclooxygenase-1 e 2 to persistent thromboxane biosynthesis in aspirin-treated essential thrombocythemia: implications for antiplatelets therapy.* Blood 2009, 115; 5: 1054-1061.
61. Rocca B., Secchiero P., Ciabattoni G. *Cyclooxygenase -2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets.* Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(11): 7634-7639.
62. Koppicar P., Goel A., Levine RL. *Efficacy of the JAK2 inhibitor INCB16562 in a murine model of MPLW515L-induced thrombocytosis and myelofibrosis.* Blood 2010; Epub.

63. Finazzi G., Rambaldi A., Guerini V., Carobbio A., Barbui T. *Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 mutation status.* Haematologica 2007; 92: 135-136.
64. Cheung B., Radia D., Pantelidis P., Yadegarfar G., Harrison C. *The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia.* Br J Haematol 2006; 132: 244-245.
65. Antonioli E., Guglielmelli P., Pancrazi A. *Clinical manifestations of JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia.* Leukemia 2005; 19: 1847- 49.
66. Adams B., Baker R., Lopez A., Spencer S. *Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome.* Emerg Med Clin 2009; 27: 459-476.
67. Hovens MC, Snoep JD., Einkenboom CJ., van der Bom JG. *Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: A syntomatic review.* American Heart Journal 2007; 175-181.
68. Jantunen R., Juvonen E., Ruutu T. *The predictive value of vascular risk factors and gender for the development of thrombotic complications in essential thrombocythemia.* Ann Hematol. 2001 Feb;80(2):74-8.