

# LA RESISTENZA AI FARMACI ANTIAGGREGANTI: VERO O FALSO PROBLEMA?

*G. F. Gensini, C. Alamanni, R. Marcucci*

**Dipartimento Area Critica Medico-Chirurgica,  
Università degli Studi di Firenze.**

Le piastrine giocano un ruolo primario nello sviluppo delle complicanze aterotrombotiche. L'attivazione piastrinica che segue il legame al fattore von Willebrand, al collagene e alla trombina a livello del sito di danno vascolare che si verifica spontaneamente durante la rottura di placca o indotto, (ad esempio), dall'intervento di rivascolarizzazione coronarica, dà inizio ad una serie di eventi che si concludono nella trombosi e determinano l'attivazione dei processi infiammatori e coagulativi. Questi eventi fisiopatologici sono alla base della comparsa di eventi ischemici, tra cui l'infarto del miocardio, l'ictus cerebrale ischemico e l'ischemia degli arti. Perciò, la possibilità di ridurre efficacemente l'attivazione piastrinica e la reattività piastrinica agli agonisti, costituisce la base fondamentale della riduzione del rischio di eventi ischemici avversi, durante e dopo la procedura di rivascolarizzazione coronarica da parte della doppia terapia antiaggregante. Gli studi clinici che hanno studiato la doppia terapia antiaggregante (CURE<sup>1</sup>, PCI-CURE<sup>2</sup> e CREDO<sup>3</sup>) hanno mostrato che la terapia combinata con aspirina e clopidogrel è più efficace nel ridurre gli eventi rispetto all'aspirina da sola, nel trattamento a breve e lungo termine delle sindromi coronariche acute. In una significativa percentuale di pazienti, tuttavia, nonostante l'uso di aspirina e clopidogrel, si verificano ancora eventi ischemici. È stato dimostrato che alcuni pazienti sottoposti a rivascolarizzazione coronarica mostrano piccole variazioni nella reattività piastrinica indotta da ADP, nonostante il trattamento con le dosi raccomandate di clopidogrel. Questo fenomeno è stato descritto come resistenza al clopidogrel. Altri studi hanno dimostrato una elevata reattività piastrinica a vari agonisti (ADP, epinefrina, collagene) o la presenza di una reattività piastrinica residua all'acido arachidonico, in pazienti trattati con aspirina e hanno definito questi pazienti come resistenti all'aspirina. D'altra parte, anche la comparsa di eventi trombotici durante la terapia antiaggregante è stata considerata e definita da alcuni Autori come resistenza agli antiplastrinici. Attualmente non esistono

metodi di laboratorio standardizzati o uniformemente riconosciuti per misurare la resistenza agli antiplastrinici. Soprattutto, non esiste nessuna definizione universalmente accettata di resistenza agli antiaggreganti.

### **Dal concetto di ‘resistenza’ agli agenti antiaggreganti a quello di ‘persistente reattività piastrinica’ in terapia antiaggregante**

È nostra opinione che la resistenza ad uno specifico agente antiaggregante è meglio definita come persistente reattività nonostante il trattamento con uno specifico agente antiplastrinico. Questa definizione implica che i pazienti stiano ricevendo un sufficiente dosaggio per produrre livelli ottimali per l’inibizione della funzione piastrinica. Comunque, non possiamo dimenticare che la trombosi è un processo multifattoriale che coinvolge vie multiple di attivazione piastrinica e altri fattori rispetto alle piastrine. Perciò, la comparsa di eventi clinici durante il trattamento con uno specifico agente antiplastrinico non può essere considerata sinonimo di ‘resistenza’ allo specifico agente terapeutico.

### **Persistente reattività piastrinica in terapia con aspirina**

#### *Valutazione di laboratorio*

Esistono diverse indagini di laboratorio in grado di misurare la risposta individuale all’aspirina: queste includono il dosaggio diretto del trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) prodotto dalle piastrine, oppure l’analisi della funzionalità piastrinica con specifici test.

#### *Test in vivo*

La produzione del TXA<sub>2</sub> può essere determinata dosando i suoi metaboliti stabili, ovvero il trombossano B<sub>2</sub> nel siero o l’11-deidro trombossano B<sub>2</sub> nelle urine, mediante metodi di tipo immunoenzimatico. Entrambi sono fortemente dipendenti dall’attività dell’enzima piastrinico ciclo-ossigenasi 1 (COX-1); pertanto possono essere considerati buoni indici “in vivo” degli effetti inibitori di basse dosi di aspirina sulle piastrine<sup>4-6</sup>. Sebbene questi metodi siano stati considerati il gold standard per la valutazione dell’effetto farmacologico dell’aspirina, non vengono utilizzati nella routine clinica, poiché hanno una scarsa sensibilità e precisione. Inoltre, la produzione di TXA<sub>2</sub> può avvenire anche attraverso vie alternative non dipendenti dalle piastrine, e questo può alterare i risultati.

#### *Test ex vivo*

Le indagini di laboratorio più comunemente usate includono test di aggregazione effettuati con l’aggregometro a trasmissione ottica di Born, con l’aggregometro a impedenza, o con metodiche point of care (PFA-100 e Ultegra RPPA). L’aggregometro a trasmissione ottica è un fotometro che misura le variazioni di trasmissione della luce attraverso una sospensione piastrinica, ottenuta dal plasma in assenza di eritrociti; questa aumenta a seguito dell’aggregazione delle piastrine quando vengono introdotti vari substrati, e l’andamento

nel tempo del segnale viene registrato graficamente. Questo test è storicamente considerato il gold standard per misurare la reattività piastrinica e rimane quello più largamente usato; in particolare, nella determinazione della risposta all'aspirina, lo stimolo con acido arachidonico risulta essere il più adatto. I risultati dell'aggregazione in vitro possono essere influenzati da numerose variabili, tra cui la concentrazione dell'agente aggregante, la conta piastrinica, l'ematocrito ed il pH plasmatici.

L'aggregometro a impedenza misura le variazioni dell'impedenza elettrica del plasma posto tra due elettrodi, in seguito all'aggregazione piastrinica indotta da vari agonisti. Il metodo è simile al precedente, ma viene effettuato su sangue intero. Il PFA-100 è, invece, una metodica point of care nata per misurare in vitro il tempo di sanguinamento<sup>7</sup>. La cartuccia monouso del PFA-100 è composta da un capillare, in cui viene aspirato un campione di sangue intero, e da una membrana biochimicamente attiva, ricoperta cioè da collagene, in aggiunta ad epinefrina o ad ADP, e dotata di un'apertura centrale. Le piastrine, passando attraverso l'apertura, sono esposte a condizioni di elevato shear stress e, a contatto con collagene e altri agonisti, vengono attivate a formare un aggregato a livello dell'apertura, rallentando gradualmente il flusso di sangue fino all'arresto. Lo strumento PFA-100 determina il tempo dall'inizio fino all'occlusione dell'apertura da parte delle piastrine e riporta tale intervallo di tempo come tempo di chiusura (TC). Il sistema PFA-100 è sensibile a molte variabili, quali, per esempio, la conta piastrinica, l'ematocrito e i livelli del fattore von Willebrand nel sangue, considerato come il maggiore determinante del tempo di chiusura.

Il metodo ULTEGRA RPFA-ASA è un altro sistema 'point of care' che misura il grado di agglutinazione di un campione di sangue intero posto a contatto con sfere rivestite di propil-gallato o, più recentemente, con acido arachidonico. L'aumento di trasmittanza riflette un'agglutinazione crescente delle piastrine con tali particelle e risulta, pertanto, proporzionale al grado di attivazione piastrinica. Se l'aspirina esercita normalmente le sue funzioni, verrà inibita l'agglutinazione e quindi non si registrerà alcun aumento della trasmittanza. I risultati vengono espressi come unità di aspirino-resistenza (ARU): valori ARU >550 sono indicativi di assenza della risposta delle piastrine al farmaco. Il limite principale di questa metodica sta nel fatto che il suo cut-off per la diagnosi di "resistenza all'aspirina" è stabilito da uno studio in cui si è effettuato il confronto con il risultato dell'aggregazione piastrinica misurata con l'aggregometro ottico (in risposta all'epinefrina), in pazienti che avevano ricevuto una singola dose di 325 mg di aspirina.

## **Cause di persistente reattività piastrinica in terapia con aspirina**

L'effetto antiaggregante dell'aspirina non è uniforme in tutti i pazienti, ma è soggetto ad una variabilità inter e intra individuale. Questa può essere attribuita a diverse cause:

### **1. Ridotta biodisponibilità dell'aspirina:**

*Dosaggio inadeguato.* Può essere legato ad una scarsa compliance del paziente nel seguire la terapia prescritta; è stato stimato, infatti, che fino ad un 40% dei pazienti non aderisce correttamente alla prescrizione medica<sup>8</sup>. Può,

però, essere dovuto anche all'assunzione di basse dosi di aspirina (inferiori a 30 mg) che non sopprimono completamente l'attività della COX-1, anche se le più recenti revisioni sistematiche dei principali trial hanno mostrato che non sembrano esserci significative differenze nell'efficacia di diversi dosaggi, compresi tra 75 e 1300 mg<sup>9,10</sup>.

## **2. Alterazioni farmacodinamiche:**

L'effetto antiplastrinico dell'aspirina può essere ridotto per interazione con altri farmaci, quali per esempio alcuni FANS (ibuprofene, indometacina, naprossene). Questo fenomeno è stato ben descritto in un elegante studio condotto nel 2001 da Catella-Lawson e collaboratori<sup>11</sup>: essi hanno dimostrato che l'assunzione di ibuprofene due ore prima dell'aspirina blocca l'azione di quest'ultima sulla COX-1 e quindi i suoi effetti sull'aggregazione piastrinica. L'aspirina, infatti, agisce bloccando l'accesso dell'acido arachidonico al sito catalitico della COX-1 mediante l'acetilazione irreversibile di un residuo serinico posto nelle vicinanze, ma non all'interno di questo sito. Al contrario, gli altri FANS sono inibitori competitivi e reversibili proprio del sito catalitico dell'enzima; pertanto il loro legame previene l'attacco dell'aspirina, e da questo deriva il mancato effetto antiaggregante. Al contrario, non è stata dimostrata nessuna interazione tra aspirina e diclofenac, rofecoxib e acetaminofene. L'importanza clinica di questa interazione farmacodinamica è stata dimostrata più recentemente nello studio condotto da MacDonald<sup>12</sup>: è emerso che i pazienti che assumevano contemporaneamente aspirina e ibuprofene, mostravano un aumento della mortalità, sia per cause cardiovascolari che per tutte le altre cause, rispetto a chi era in solo trattamento con aspirina o che assumeva altri FANS.

## **3. Altre fonti di produzione del TXA<sub>2</sub>:**

La biosintesi del TXA<sub>2</sub> può avvenire anche attraverso vie che non sono bloccate dall'aspirina; per esempio, quella mediata dalla ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) presente nei macrofagi, nei monociti e nelle cellule endoteliali. Grazie a questo enzima, tali cellule producono prostaglandina H<sub>2</sub>, che può essere sfruttata dalle piastrine come "substrato" per la produzione del trombossano, aggirando così l'inibizione della COX-1 mediata dall'aspirina. Questo meccanismo può verificarsi con molta probabilità negli stati infiammatori, quali anche i processi aterosclerotici, dove le citochine e i mediatori della flogosi inducono la sintesi della COX-2<sup>13,14</sup>. Dati recenti hanno suggerito, inoltre, che potrebbe essere presente un'attività della COX-2 anche a livello piastrinico: nel citoplasma di piastrine lavate è stata riscontrata, infatti, l'espressione di COX-2 mRNA, determinata attraverso amplificazione con PCR, e la presenza della proteina enzimatica stessa, identificata con tre specifici anticorpi al Western blotting. Essendo l'aspirina molto meno attiva sulla COX-2 rispetto alla COX-1, si può ipotizzare che tale isoforma non venga sufficientemente inibita dal farmaco e che, quindi, possa essere causa di una persistente attività piastrinica<sup>15</sup>.

## **4. Presenza di vie alternative di attivazione piastrinica:**

Attivazione piastrinica indotta dai globuli rossi, dallo shear stress, dalla stimolazione dei recettori piastrinici del collagene, di ADP, dell'epinefrina, della trombina, del fattore von Willebrand.

### **5. Aumentato turnover piastrinico:**

Durante gli interventi di by-pass aorto-coronarico, nell'infiammazione o negli stati infettivi, si verifica un aumento del rilascio di piastrine nell'intervallo compreso tra due somministrazioni di aspirina (24 ore); considerando la breve presenza in circolo del farmaco, queste cellule non risultano soggette alla sua azione <sup>16</sup>.

### **6. Fattori genetici:**

Sono stati identificati centinaia di polimorfismi di singoli nucleotidi nei geni coinvolti nella via di sintesi del trombossano; ma i loro effetti sulla risposta piastrinica all'aspirina non sono ancora chiari. La resistenza all'aspirina è stata associata con:

- polimorfismi di COX-1 <sup>17</sup>, COX-2 <sup>18</sup>, trombossano-sintasi;
- polimorfismi delle glicoproteine di membrana Ia/IIa e Ib/V/IX <sup>19</sup>;
- polimorfismi del complesso glicoproteico IIb/IIIa.

Il nostro gruppo ha recentemente valutato il ruolo di alcuni polimorfismi a carico del gene codificante la GpIa, nella risposta piastrinica alla doppia terapia antiaggregante, in 289 pazienti con infarto del miocardio, sottoposti ad angioplastica coronarica <sup>20</sup>. La reattività piastrinica è stata misurata sia con metodica point of care (PFA-100), che con aggregazione su plasma ricco di piastrine. I polimorfismi C807T/G873A, ma non il T837C, sono risultati associati con una più elevata reattività piastrinica. I portatori dell'allele 807T/873A avevano livelli di aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico e da collagene più elevati. All'analisi multivariata, i polimorfismi C807T/ G873A sono risultati un fattore di rischio indipendente dalla persistente reattività piastrinica definita sia sulla base dell'aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico (OR=3.0, 95%CI 1.17-7.89, p=0.022), che dal sistema point of care PFA-100 (OR=4.1, 95%CI 1.53-10.89, p=0.005).

### **7. Tachifilassi:**

Con tale termine si intende la perdita dell'effetto antiplastrinico dell'aspirina a seguito di una somministrazione prolungata. Questo fenomeno è stato ben documentato in uno studio pubblicato nel 2004: è stato dimostrato che l'inibizione della risposta piastrinica all'aspirina diminuiva nel tempo (la massima percentuale di aggregazione indotta dal collagene – Mx% – diminuiva dall'88.2% al 37.9% a 2 mesi), mentre rimaneva sugli stessi livelli in risposta alla ticlopidina. La perdita dell'effetto antiaggregante si osservava a partire dal sesto mese e diventava più evidente nei mesi successivi, tanto che a 24 mesi il 43% dei pazienti presentava gli stessi livelli di aggregazione misurati all'inizio dello studio <sup>21</sup>. Questa osservazione è conforme con l'aumento dell'incidenza di esiti cardiovascolari avversi in coloro che sono in terapia cronica con aspirina. Questo andamento potrebbe essere legato alla riduzione della compliance nel tempo <sup>22</sup>, pur essendo stato proposto anche un ruolo della progressione dell'aterosclerosi.

## **Implicazioni cliniche della persistente reattività piastrinica in terapia con aspirina**

Un numero crescente di studi suggerisce che la resistenza all'aspirina è

importante dal punto di vista clinico. Numerosi studi prospettici hanno valutato la relazione tra reattività piastrinica, terapia con aspirina ed il rischio di nuovi eventi vascolari.

### ***Malattia cerebrovascolare***

Due studi su pazienti con malattia cerebrovascolare hanno tentato di correlare la presenza di resistenza all'aspirina con end-points clinici. Dopo aver dimostrato una prevalenza del 33% di resistenti all'aspirina in un gruppo di 180 pazienti con un ictus ischemico, Grotemeyer et al<sup>23</sup> hanno seguito la stessa coorte di pazienti per 2 anni. Tra i 174 pazienti che hanno completato il follow-up, coloro che avevano una resistenza all'aspirina avevano un rischio 10 volte maggiore di nuovi eventi vascolari (40% vs 4.1%,  $p < 0.0001$ ). Più recentemente, attraverso un'analisi retrospettiva sulla funzione piastrinica valutata con il point of care PFA-100, uno studio ha dimostrato che in 53 pazienti trattati con aspirina per la prevenzione secondaria di TIA e/o ictus, la frequenza di resistenti all'aspirina era significativamente più elevata (34%) in quelli con eventi cerebrovascolari ricorrenti rispetto agli altri (0%) ( $p = 0.0006$ )<sup>24</sup>.

Questi risultati indicano che la persistente reattività piastrinica in terapia con aspirina può contribuire al fallimento della terapia profilattica con aspirina; ma il loro significato è limitato dal basso numero di pazienti arruolati e dalle differenze nei metodi e/o cut-off utilizzati per definire la risposta all'aspirina.

### ***Arteriopatia periferica***

Uno studio su 100 pazienti in terapia con aspirina 100 mg/die sottoposti ad angioplastica per claudicatio intermittens ha mostrato, sulla base dell'aggregazione su sangue intero, dopo un follow-up di 18 mesi, un rischio di riuclusione nei pazienti resistenti all'aspirina, significativamente più elevato rispetto a quelli che mostravano una normale risposta al farmaco ( $p = 0.0093$ )<sup>25</sup>.

### ***Malattia cardiovascolare***

Nel 2002 un sotto-studio del trial HOPE, condotto da Eikelboom et al, ha analizzato la responsività all'aspirina misurando i livelli urinari di 11-deidro trombossano B<sub>2</sub>, un indicatore in vivo della formazione di TXA<sub>2</sub>. La probabilità aggiustata per gli esiti combinati di infarto miocardico, ictus o morte cardiovascolare aumentava all'aumentare dei livelli urinari di 11-deidro-TBX<sub>2</sub>; dividendo la popolazione in quartili in base ai valori crescenti del metabolita nelle urine, il rischio di sviluppare eventi avversi era 1,8 volte maggiore nei pazienti appartenenti al quartile più alto (>33.8 mg/mol creatinina) rispetto alla popolazione appartenente al quartile più basso (<15.1 mg/mol creatinina, indicativo della soppressione della produzione di TXA<sub>2</sub>), con un rischio relativo di 3.5<sup>4</sup>.

Nel 2003 Gum ha pubblicato i risultati di uno studio condotto su 326 pazienti con malattia cardiovascolare stabile che assumevano 325 mg/die di aspirina: i pazienti che mostravano una persistente reattività piastrinica (definita da un'aggregazione media >70% a 10 mmol-ADP e >20% a 0.5 ng/ml di acido arachidonico) erano il 5.2%; di questi il 24% ha avuto, nel periodo del follow-up, un evento maggiore (IMA, accidente cerebrovascolare o morte cardiaca),

in confronto al 10% dei pazienti “non resistenti”. Dopo aggiustamento per 12 potenziali fattori di rischio, la resistenza all’aspirina rimaneva un elemento predittivo indipendente per la comparsa di eventi avversi a lungo termine (Hazard Ratio stimata di 4.1) <sup>26</sup>.

Chen e coll hanno valutato la resistenza all’aspirina nell’ambito della rivascolarizzazione coronarica percutanea. Utilizzando il metodo ‘point of care’ Ultegra RPPA-ASA, su 151 pazienti sottoposti ad una PTCA elettiva, il 19.2% dei pazienti risultava avere una persistente reattività piastrinica. Nonostante un adeguato pretrattamento con clopidogrel ed il trattamento con eparina in rapporto alla procedura, l’innalzamento dei livelli di CK-MB e cTnI era molto più frequente nei pazienti con resistenza all’aspirina rispetto agli altri (per CK-MB: 51.7% vs 24.6%, per cTnI 65.5% vs. 38.5%) <sup>27</sup>. Usando la stessa metodica ‘point of care’ per definire la resistenza all’aspirina in 422 pazienti con coronaropatia stabile, lo stesso gruppo ha dimostrato che, dopo un follow-up di 379±200 giorni, i pazienti con resistenza all’aspirina avevano un più elevato rischio di morte, sindromi coronariche acute o di ictus ischemico rispetto agli altri [14.2% vs 5.2%; HR=2.92 (95%CI 1.50-5.67); p=0.002] <sup>28</sup>.

Il nostro gruppo ha recentemente pubblicato dati su 147 pazienti con infarto miocardico sottoposti a rivascolarizzazione coronarica in urgenza e seguiti con un follow-up di 12 mesi <sup>29</sup>. La funzione piastrinica è stata valutata con il metodo ‘point of care’ PFA-100. Al follow-up sono stati registrati eventi avversi cardiovascolari in 44/146 (30.1%) pazienti: 15 morti cardiovascolari, 12 restenosi e 17 nuovi infarti. Una persistente reattività piastrinica è stata documentata in 41/146 (28.0%) pazienti. 18/41 (43.9%) pazienti con resistenza all’aspirina hanno avuto un evento avverso rispetto a 26/105 (24.8%; p<0.05) pazienti con normale risposta all’aspirina. All’analisi di Kaplan-Meier, il rischio globale di eventi avversi maggiori era significativamente più elevato nei pazienti con resistenza all’aspirina (p=0.02). All’analisi di regressione di Cox – aggiustata per età, sesso, diabete, numero di vasi con stenosi critiche e frazione di eiezione (ovvero i parametri con una significativa maggior prevalenza nei pazienti con eventi avversi maggiori) – la resistenza all’aspirina rimaneva un fattore di rischio indipendente per la comparsa ad 1 anno di eventi maggiori [HR=2.9 (95%CI 1.1-9.2), p<0.05].

## **Persistente reattività piastrinica in terapia con clopidogrel**

### *Valutazione di laboratorio*

Poiché il clopidogrel inibisce in modo specifico uno dei due recettori dell’ADP (P2Y<sub>12</sub>), la misura della massima aggregazione piastrinica da ADP tramite aggregometria ottica è il più comune metodo di laboratorio usato per valutare la risposta al clopidogrel ed è considerato il gold standard. La misura in citofluorimetria dell’espressione dei recettori attivati della GpIIb/IIIa e dell’espressione di P-selectina dopo stimolo con ADP può ugualmente identificare la resistenza al clopidogrel ed è risultata correlata con l’aggregazione massima indotta da ADP. Il metodo ‘point of care’ proposto più recentemente come alternativa ai test tradizionali è il VerifyNow P2Y<sub>12</sub> Assay. Lo stato di fosforilazione del VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) rappresenta uno specifico marcatore intracellulare dell’attività residua del recettore P2Y<sub>12</sub> e può



essere misurato con citofluorimetria. Questa tecnica è probabilmente l'indicatore più specifico dell'attività residua del recettore P2Y<sub>12</sub> in pazienti trattati con un inibitore del P2Y<sub>12</sub>. Tuttavia è una metodica indaginosa, che richiede personale esperto ed ha un elevato costo, per cui non è proponibile per l'applicazione su larga scala.

## **Cause di “persistente reattività piastrinica” in terapia con clopidogrel**

Diversi meccanismi possono essere chiamati in causa per spiegare la “resistenza” al clopidogrel e possono essere ricondotti a due gruppi principali: fattori estrinseci e fattori intrinseci.

### **1. Fattori estrinseci**

#### *Interazione con altri farmaci*

Qualsiasi farmaco che inibisca o che sia substrato del citocromo P450 3A4 può potenzialmente bloccare la conversione di clopidogrel nel suo metabolita attivo. Esistono, infatti, varie classi di farmaci considerati induttori o inibitori del citocromo; essi, regolando il grado di attività dell'enzima, possono influenzare indirettamente i livelli del metabolita attivo del clopidogrel, e quindi il grado di inibizione della funzione piastrinica<sup>28</sup>. Tra i primi si cita, per esempio, la rifampicina; tra i secondi l'eritromicina. A tal proposito è stata accuratamente indagata la possibile interazione tra clopidogrel e statine. I dati riportati in letteratura sono contrastanti: infatti, Lau e colleghi<sup>30</sup> hanno effettivamente mostrato che l'atorvastatina produceva una riduzione statisticamente significativa e dose dipendente dell'inibizione piastrinica (la percentuale di aggregazione piastrinica, nonostante l'assunzione di clopidogrel, era circa del 58% con 10 mg di atorvastatina, e saliva all'89% con 40 mg). Tuttavia, analisi retrospettive sui dati riportati da più trial clinici, tra cui erano compresi gli studi CREDO, PRONTO e MITRA PLUS, non hanno permesso di rilevare una significativa influenza delle statine sugli effetti piastrinici del clopidogrel<sup>3,31,32,33</sup>.

#### *Ridotto assorbimento intestinale*

Taubert e colleghi, misurando, in individui apparentemente sani, i livelli dei metaboliti liberi del clopidogrel, sia attivi che inattivi, hanno indicato nell'assorbimento intestinale il principale fattore determinante la produzione dei metaboliti attivi<sup>34</sup>. In linea con questi risultati si pongono quelli riportati dal trial ISAR-CHOICE: confrontando, infatti, gli effetti del clopidogrel sull'inibizione della risposta piastrinica a dosi crescenti di carico (300, 600 e 900 mg) è stato mostrato che non ci sono vantaggi ulteriori nella somministrazione di dosi superiori a 600 mg, poiché non si ottiene un corrispondente aumento delle concentrazioni del metabolita attivo e del farmaco non modificato nel plasma. Questo suggerisce che l'assorbimento intestinale del farmaco si riduce notevolmente per valori che eccedono i 600 mg<sup>35</sup>.

### **2. Fattori intrinseci**

Alcuni fattori cellulari possono essere responsabili di una risposta variabile al clopidogrel; tra questi si considerano significativi:



### *Polimorfismi del recettore piastrinico P2Y12*

È stato osservato che le piastrine di soggetti portatori di questi polimorfismi mantenevano la capacità di cambiare forma se esposte all'ADP, ma mostravano solo una aggregazione debole e reversibile. Fontana e colleghi hanno identificato 4 polimorfismi sul gene codificante il recettore P2Y12; sono stati definiti un alotipo maggiore, H1, non contenente nessuno dei 4 polimorfismi, e un alotipo minore, H2, contenente tutti e 4 i polimorfismi. È stato osservato che nei soggetti H2/H2 esisteva un'associazione con un'aumentata aggregazione piastrinica in risposta a ADP 2 $\mu$ M, pari all'82.4%, in confronto al 34.7% nei soggetti H1/H1 <sup>36</sup>.

### *Polimorfismi del citocromo epatico P450 3A4*

Sono stati identificati più di 30 polimorfismi diversi nel gene per il CYP3A4 <sup>37</sup>; essi potrebbero contribuire alla variabilità interindividuale nell'attività dell'enzima e quindi ai variabili livelli dei metaboliti attivi del clopidogrel. Il rapporto con gli effetti antiaggreganti del farmaco è stato solo ipotizzato, ma al momento non confermato da alcun dato.

## **Implicazioni cliniche della persistente reattività piastrinica in terapia con clopidogrel**

Il primo studio che ha mostrato l'esistenza di un'associazione tra resistenza al clopidogrel e rischio cardiovascolare è stato quello di Matetzky e coll <sup>38</sup>. Su 60 pazienti ricoverati per infarto miocardico con sopralivellamento del tratto ST (STEMI), sottoposti ad angioplastica coronarica e trattati con duplice terapia antiaggregante, è stata riportata una percentuale di resistenza al clopidogrel nel 25% dei casi. I pazienti con livelli di aggregazione da ADP nel quarto quartile avevano un 40% di probabilità di eventi clinici entro 6 mesi.

Nel trial PREPARE POST-STENTING (Platelet REactivity in PATients and Recurrent Events post-stenting) <sup>39</sup> i pazienti che avevano una recidiva di evento ischemico entro 6 mesi da una rivascolarizzazione coronarica percutanea elettiva, avevano una reattività piastrinica indotta da ADP più elevata rispetto a quelli liberi da eventi successivi, nonostante la duplice terapia antiaggregante. Negli studi CLEAR PLATELETS (Clopidogrel Loading with Eptifibatide to Arrest platelet Reactivity) <sup>40</sup> e CLEAR PLATELETS Ib <sup>41</sup>, una dose di carico di clopidogrel di 600 mg in pazienti sottoposti a rivascolarizzazione elettiva, era associata con una inibizione piastrinica superiore rispetto a 300 mg; e questa inibizione era accompagnata da una mionecrosi minore e da un diminuito rilascio di citochine proinfiammatorie.

Cuisset e coll <sup>42</sup> hanno mostrato che pazienti con un'elevata reattività piastrinica dopo rivascolarizzazione coronarica, avevano un aumento del rischio di eventi cardiovascolari. Da sottolineare che questi pazienti erano resistenti sia a clopidogrel che ad aspirina. Un più elevato numero di recidive di eventi ischemici entro 6 mesi dalla procedura è stato osservato in pazienti che, in terapia cronica con clopidogrel, erano sottoposti a stenting elettivo e che prima della procedura avevano più elevati valori di aggregazione indotta da ADP.

Il nostro gruppo ha mostrato che, in pazienti con STEMI sottoposti a rivascolarizzazione coronarica primaria ed in duplice terapia antiaggregante, una

persistente reattività piastrinica (valutata tramite aggregazione da acido arachidonico e da ADP e tramite il sistema point of care PFA-100) è un elemento predittivo indipendente dell'entità della miocardionecrosi. Tutti questi dati suggeriscono fortemente che un'elevata reattività piastrinica, nonostante la terapia antitrombotica raccomandata è un fattore di rischio per ischemia in pazienti sottoposti a rivascolarizzazione coronarica percutanea.

Nello studio CREST<sup>43</sup> è stata studiata la funzione piastrinica in 30 pazienti con trombosi intrastent comparsa entro 1.5 anni dall'intervento primario. Anche se il campione in esame era limitato, lo studio ha dimostrato in modo convincente che la persistente reattività piastrinica e l'incompleta inibizione del recettore P2Y12 sono fattori di rischio per l'insorgenza di una trombosi su stent. Ulteriori risultati importanti sono emersi dallo studio di Wenaweser e coll, i quali hanno realizzato un'analisi comparata della risposta ad aspirina e clopidogrel nei pazienti con trombosi subacuta intrastent<sup>44</sup>. La prevalenza di resistenza combinata a clopidogrel ed aspirina è risultata significativamente maggiore nei pazienti con trombosi intrastent.

Sulla base di queste evidenze e nonostante non sia stata dimostrata la superiorità di un dosaggio più elevato di clopidogrel nel ridurre le complicanze ischemiche, le attuali linee guida ACC/AHA forniscono come raccomandazione di Classe IIb che "nei pazienti in cui la trombosi subacuta può essere catastrofica o letale...gli studi di aggregazione piastrinica possono essere considerati e la dose di clopidogrel aumentata a 150 mg/die se viene dimostrata un'inibizione dell'aggregazione piastrinica inferiore al 50%"<sup>45</sup>. Queste indicazioni, tuttavia, non specificano la metodologia che deve essere usata e, soprattutto, esistono dati clinici molto limitati a sostegno del cut-off dell'inibizione al 50%.

## Conclusioni

Nonostante la nostra crescente conoscenza del fenomeno della cosiddetta 'resistenza' all'aspirina e al clopidogrel, gli studi finora a disposizione sono limitati sia per numero che per caratteristiche. Non esiste accordo sulla definizione di 'resistenza' e se la definizione debba essere basata sugli end-point clinici, sull'evidenza di laboratorio o su entrambe, e non abbiamo criteri per distinguere la vera resistenza dall'insuccesso del trattamento legato alla natura multifattoriale dell'aterotrombosi. Nonostante questo, i dati che si stanno accumulando a sottolineare il ruolo della persistente reattività piastrinica nel rischio clinico di recidiva di eventi ischemici, stimolano la ricerca a valutare su larga scala e con metodi riproducibili, la validità dei dati ottenuti finora su piccole popolazioni e con metodiche differenti. Attualmente sono in corso i seguenti trial: a) un sottostudio del CHARISMA valuterà, tramite il dosaggio dei livelli di 11-deidroTXB2 urinario, il ruolo dell'aggiunta del clopidogrel all'aspirina nei pazienti con resistenza all'aspirina<sup>46</sup>; b) Il trial ASCET<sup>47</sup> (ASpirin nonresponsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) sta valutando se il passaggio a clopidogrel offrirà una protezione superiore rispetto al proseguimento della sola aspirina nel ridurre gli eventi clinici avversi nei pazienti con resistenza all'aspirina e coronaropatia angiograficamente documentata; c) Il trial RESISTOR (Research Evaluation to Study Individuals who Show Thromboxane Or P2Y12 receptor Resistance) valuterà se la modifica del dosaggio degli an-

tipiastrinici è in grado di prevenire o ridurre la mionecrosi dopo procedure di ri-vascularizzazione coronarica in pazienti con resistenza ad aspirina e clopidogrel.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345:494-502
- 2) Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pre-treatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE. *Lancet* 2001; 358:527-533
- 3) Steinhilber SR, Berger PB, Mann III JT, Fry ETA, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ, for CREDO Investigators. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:2411-2420
- 4) Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105:1650-55
- 5) Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerard GA. 11-dehydrothromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5861-65
- 6) Perneby C, Granstrom E, Beck O, FitzGerard D, Harhen B, Hjemdahl P. Optimization of an enzyme immunoassay for 11-dehydro-thromboxane B2 in urine: comparison with GC-MA. *Thromb Res* 1999; 96: 427-36
- 7) Jilma B, Fuchs I. Detecting aspirin resistance with the platelet function analyzer (PFA-100)[Letter]. *Am J Cardiol* 2001; 88:1348-9
- 8) Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, Defranco A. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2005; 95:973-75
- 9) Patrono C, Collier B, Fitzgerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects - the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126 (3 suppl):234s-64s
- 10) Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death myocardial infarction and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86
- 11) Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerard GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345:1809-1817
- 12) MacDonald TM, Wei L. Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet* 2003; 361:573-574
- 13) Poulsen TS, Mickley H. Is the antiplatelet effect of aspirin affected by systemic inflammation? *Ann Hematol* 2004; 83:728
- 14) Ziegler S, Alt E, Brunner M, Speiser W, Minar E. Influence of systemic inflammation on efficiency of antiplatelet therapy in PAOD patients. *Ann Hematol* 2004; 83:92-94
- 15) Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schror K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *The Lancet* 1999; 333:900
- 16) Zimmermann N, Wenk A, Kim U, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108: 542-547

- 17) *Halushka M, Walker LP, Halushka PV.* Genetic variation in cyclooxygenase 1. Affects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:122-30
- 18) *Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, et al.* Identification of new element of clopidogrel stability (INES) study group. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction or stroke. *JAMA* 2004; 29:2221-28
- 19) *Cambria Kiely JA, Gandhi PJ.* Aspirin resistance and genetic polymorphism. *J Thromb Thrombolysis* 2002; 14:51-58
- 20) *Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Sestini I, Saracini C, Paniccchia R, Poli S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Gensini GF, Abbate R.* Role of glycoprotein Ia gene polymorphisms in determining platelet function in myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention on dual antiplatelet treatment. *Atherosclerosis* 2006; doi:10.1016/j.atherosclerosis 2006;11:009
- 21) *Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F.* Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:979-84
- 22) *Hankey G, Eikelboom J.* Aspirin resistance. *Lancet* 2006; 367:606-617
- 23) *Grotemeyer KH, Scharafinsky HW, Husstedt JW.* Two years follow-up of aspirin responders and aspirin non responders. A pilot study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 1993; 71:397-403
- 24) *Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H.* Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol* 2003; 250:63-6
- 25) *Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E.* Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients, submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78:1003-7
- 26) *Gum PA, Kotike-Marchant K, Welsh PA, White J Topol EJ.* A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:961-65
- 27) *Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP.* Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1122-1126
- 28) *Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok YY, Lau CP.* Prevalence, profile, predictors and natural history of aspirin resistance measured by Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA in patients with coronary heart disease [abstract]. *Circulation* 2005; 111:e339
- 29) *Marcucci R, Paniccchia R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF.* Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol* 2006; 98:1156-9
- 30) *Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, et al.* Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*. 2004; 109:166-171
- 31) *Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, et al.* Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003; 107:32-37
- 32) *Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, Kereiakes DJ, Serebruany VL, Brennan D, Topol EJ.* Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation* 2003; 108:921-924
- 33) *Serebruany VL, Midei MG, Malinin AI, Oshrine BR, Lowry DR, Sane DC, Tanguay JF, Steinhubl SR, Berger PB, O'Connor CM, Hennekens CH.* Absence of interaction between atorvastatin or other statin and clopidogrel: results from the in-

- teraction study. *Arch Intern Med* 2004; 164:2051-2057
- 34) *Taubert D, et al.* Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004; 92:311-316
  - 35) *von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schomig E, Kastrati A, Schomig A.* Absorption, metabolism, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR CHOICE. *Circulation* 2005; 112:2946-50
  - 36) *Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al.* Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108:2971-3
  - 37) *Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE.* Genetic contribution to variable human CYP3A4-mediated metabolism. *ADV Drug Deliv Rev* 2002; 54:1271-94
  - 38) *Matetzky S, et al.* Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109:3171-3175
  - 39) *Gurbel PA, et al.* Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting. Results of the PREPARE POST-STENTING study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1820-6
  - 40) *Gurbel PA, Bliden KP, Zaman KA, Yoho JA, Hayes KM, Tantry US.* Clopidogrel loading with eptifibatid to arrest the reactivity of platelets: results of the clopidogrel Loading with eptifibatid to arrest the reactivity of platelets (CLEAR PLATELETS) study. *Circulation* 2005; 111:1153-9
  - 41) *Gurbel PA, Bliden KP, Tantry US.* The effect of clopidogrel with and without eptifibatid on tumor necrosis factor-alpha and C-reactive protein release after elective stenting: results of the CLEAR PLATELETS-Ib study. *J Am Coll Cardiol* in press
  - 42) *Cuisset T, Frere C, Quilici J, Barbou F, Morange PE, Hovasse T, Bonnet JL, Alessi MC.* High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4(3):542-9
  - 43) *Gurbel PA, et al.* Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis. Results of the CREST study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1827-32
  - 44) *Wenaweser P, Dorffler-Melly J, Imboden K, Windecker S, Togni M, Meier B, Haerberli A, Hess OM.* Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1748-52
  - 45) *Smith Jr SC, Feldman TE, Hirshfeld Jr JW, Jacobs AK, Kern MJ, King 3rd SB, et al.* American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; ACC/ AHA/ SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention. ACC/ AHA/ SCAI 2005 guidelines update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation* 2006; 113:e166-286
  - 46) *Bhatt DL, Topol EJ.* Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high risk primary prevention: rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance (CHARISMA) trial. *Am Heart J* 2004; 148:263-268
  - 47) *Petterson AA, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H.* Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin non-responders: a prospective, randomized trial. The ASCET (Aspirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. *Scand cardiovasc J* 2004; 38:353-356