- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.216.251.37 Mon, 29 Apr 2024, 12:53:35

Casi clinici

# Ipersensibilità agli anticoagulanti orali: descrizione di un caso

Marco Mariano Patella, Pina Elvira Russo, Domenico De Lucia*, Maurizio Margaglione**, Donatella Colaizzo**, Aldo Iacono

*Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche Cardiologiche, Respiratorie e Toraciche, *Istituto di Patologia Generale e Oncologia, Seconda Università degli Studi, Napoli, **Unità di Aterosclerosi e Trombosi, IRCCS, Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo (FG)*

*Key words:*
**Anticoagulation; CYP2C9 polymorphism; Warfarin.**

**We report a case regarding a 71 year-old Caucasian man with NYHA functional class III congestive heart failure, who was under warfarin treatment due to left ventricular thrombosis. After a few days, although the drug was not overdosed, the INR increased up to 11.68. Normal values were reestablished only after a 20-day pharmacological wash-out. Surprisingly, no episode of major or minor bleeding occurred. Gene typing of cytochrome P450 CYP2C9, a liver enzyme responsible for warfarin metabolism, showed that the patient was a carrier of both the mutant alleles (CYP2C9*2/*3) of this enzyme. This genetic defect caused a reduced catabolism of S-warfarin and excessive anticoagulation.**

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (3): 303-306)

© 2001 CEPI Srl

Ricevuto il 28 marzo 2000; nuova stesura il 19 dicembre 2000; accettato l'8 gennaio 2001.

*Per la corrispondenza:*

Dr. Marco Mariano Patella

*Via F. Angrisani, 9*
*84043 Agropoli (SA)*

## Introduzione

La terapia con anticoagulanti cumarinici espone a rischio di emorragie. Da ciò la necessità di un'attenta osservazione clinica e il monitoraggio di alcuni parametri di laboratorio (tempo di protrombina, INR, tempo di tromboplastina parziale attivato). Le cause di eccessiva anticoagulazione sono essenzialmente tre: sovradosaggio del farmaco, fattori predisponenti secondari o acquisiti (più frequenti e più facili da accertare) e fattori predisponenti primitivi o genetici (molto più rari, spesso latenti perché compensati, nonché di difficile definizione molecolare). Queste alterazioni genetiche riguardano i fattori e/o gli inibitori della coagulazione vitamina K-dipendenti (che sono il bersaglio dell'azione degli anticoagulanti cumarinici), oppure gli enzimi deputati al catabolismo dei cumarinici stessi, e dell'S-warfarin in particolare, cioè il citocromo P450 CYP2C9[1]. Il caso clinico proposto è appunto un esempio di quest'ultimo tipo di alterazione.

## Caso clinico

M.C., di 71 anni, di razza caucasica, è stato ricoverato nel nostro Reparto di Cardiologia per cardiopatia dilatativa post-ischemica, complicata da due recenti episodi di tachiaritmia (uno sopraventricolare e l'altro ventricolare), sintomatici rispettivamente per lipotimia e sincope. Dalla raccolta dell'anamnesi risultavano: diabete mellito tipo II, broncopneumopatia cronica ostruttiva, arteriopatia cronica ostruttiva degli arti inferiori bilaterale (stadio IIb), iperplasia prostatica.

L'esame obiettivo mostrava condizioni generali discrete, decubito semiortopnoico obbligato; presenza di III tono sull'aia del ventricolo sinistro all'ascoltazione cardiaca; al torace rantoli basali bilaterali; fegato all'arco, non dolente, con assenza di reflusso epatogiugulare; agli arti inferiori assenza di edemi, cute fredda, lucida e sottile, ipotrofia delle masse muscolari e iposfigmia dei polsi arteriosi. I comuni esami di laboratorio non presentavano alterazioni di rilievo.

L'ECG mostrava: ritmo sinusale con frequenza di 60 b/min; asse del QRS -105°; PR 0.20 s; QRS 0.12 s; QTc 0.44 s; presenza di complessi QS in D2, D3, aVF e da $V_7$ a $V_9$; mancata progressione dell'onda R da $V_3$ a $V_6$; onda Q di necrosi da V3R a V6R; blocco di branca destro completo.

All'esame ecocardiografico furono dimostrate, nella regione apicale del ventricolo sinistro, discinesia e presenza di formazione trombotica adesa alla parete. Si

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.216.251.37 Mon, 29 Apr 2024, 12:53:35



iniziò, pertanto, terapia anticoagulante con warfarin sodico (ad una dose il primo giorno di 15 mg e poi secondo lo schema riportato nella tabella I), e calciparina 0.5 ml/12 500 UI (1 fiala × 2 sottocute soltanto per 1 giorno). Gli esami preliminari per tale terapia (tempo di protrombina, INR, tempo di tromboplastina parziale attivato, fibrinogeno, conta piastrinica e valutazione della funzionalità epatica) erano tutti nella norma, né dall'anamnesi risultava diatesi emorragica nel paziente o nei familiari.

Dallo schema della terapia anticoagulante, riportato nella tabella I, risulta che, nonostante la riduzione del dosaggio del warfarin a 2.5 mg al terzo giorno e poi la sospensione della terapia al settimo giorno, il valore dell'INR raggiunse, al decimo giorno, il picco di 11.68, che si ridusse a 3.201 soltanto al diciassettesimo giorno. Un valore dell'INR pressoché normale si riottenne soltanto al ventottesimo giorno, e, considerata la notevole diminuzione di volume del trombo all'ecocardiogramma, il paziente fu dimesso. Si segnala, inoltre, che il paziente, pur avendo raggiunto un valore massimo di INR di 11.68, non manifestò emorragie maggiori né minori durante la terapia, il che era reso di più facile accertamento per la presenza di catetere vescicale, introdotto in seguito ad un episodio di ritenzione urinaria acuta da iperplasia prostatica, verificatosi 2 giorni dopo l'inizio della terapia anticoagulante.

**Tabella I.** Dosaggio del tempo di protrombina (PT), dell'INR, del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e relativa terapia farmacologica.

| Giorno | PT (%) | INR | APTT (s) | Terapia |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 92.5 | 1.043 | 23.8 | Warfarin 15 mg + calciparina 0.5 ml/ 12 500 UI (1 fiala × 2) |
| 2 | 82.7 | 1.103 | 39.2 | Warfarin 10 mg |
| 3 | 28.6 | 2.15 | 30.6 | Warfarin 2.5 mg |
| 4 | 15.7 | 3.874 | 34.2 | Warfarin 1.25 mg |
| 5 | | | | Warfarin 1.25 mg |
| 6 | | | | Warfarin 2.5 mg |
| 7 | 5.7 | 8.399 | 44.4 | Warfarin 1.25 mg |
| 8 | 7.9 | 6.253 | 46.8 | |
| 9 | 6.2 | 7.74 | 47.8 | |
| 10 | 4 | 11.68 | 51.8 | |
| 11 | 5.2 | 9.172 | 51.1 | |
| 12 | 14.4 | 5.12 | 62.5 | |
| 13 | 7.9 | 6.941 | 47.2 | |
| 14 | 9.83 | 5.72 | 54.5 | |
| 17 | 16.4 | 3.201 | 36.8 | |
| 22 | 53.6 | 1.382 | 25.2 | |
| 28 | 64.3 | 1.261 | 30.4 | |

Sono state eseguite le seguenti indagini per cercare di interpretare il fenomeno osservato:

• valutazione della funzionalità epatica: i marker epatitici erano positivi per pregressa epatite A, ma negativi per epatite B, C, D. L'ecografia del fegato era sostanzialmente normale, salvo un lieve ingrandimento dell'organo con ecostruttura finemente disomogenea come da steatosi;

• stato delle vie biliari: assenza di segni clinici di stasi, gamma-glutamiltranspeptidasi, pseudocolinesterasi e bilirubina normali, assenza di dilatazione od ostruzione all'ecografia;

• interazioni farmacologiche[2]: dall'anamnesi non risultava una recente assunzione di antibiotici, e durante il ricovero fu somministrata amoxicillina 1 g per un solo giorno a causa di bruciori minzionali: ciò permette di escludere alterazioni della flora batterica intestinale con deficit secondario di vitamina K. Va inoltre rilevata la somministrazione, nel caso in discussione, allo scopo di prevenire aritmie ventricolari, di amiodarone (200 mg × 2/die), iniziata al ricovero e continuata per tutta la durata della terapia anticoagulante.

Esclusi i fattori predisponenti secondari o acquisiti di ipersensibilità al warfarin, abbiamo indagato sulla presenza di fattori predisponenti primitivi o genetici[3]:

• il dosaggio dei fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti è riportato nella tabella II (valori normali nella popolazione sana di controllo 70-120%). Dalla tabella suddetta risulta che i valori dei fattori II e X, normali basalmente, erano nettamente diminuiti nel dosaggio eseguito durante terapia con warfarin. Ciò potrebbe far supporre un'anomalia genetica slatentizzata dal warfarin. Il dosaggio biochimico è stato effettuato con metodica di curva di calibrazione con plasma carente (Instrumentation Laboratory, Milano). La lettura spettrofotometrica è stata eseguita su apparecchia-

**Tabella II.** Dosaggio dei fattori e degli inibitori vitamina K-dipendenti.

| | Primo dosaggio (INR 6.941) | Secondo dosaggio (INR ritornato alla norma) | Terzo dosaggio (a 6 mesi) |
|---|---|---|---|
| Fattore II | 5% | 69% | 86% |
| Fattore VII | 10% | 54% | 77% |
| Fattore IX | 19% | 98% | 130% |
| Fattore X | 6% | 140% | 90% |
| Proteina C | 26.7% | 73.7% | 85% |
| Proteina S | 39% | 80% | 82% |

Primo dosaggio: in corso di trattamento con warfarin (giorno 13); secondo dosaggio: dopo 3 mesi di sospensione del farmaco; terzo dosaggio: dopo 6 mesi dalla sospensione del farmaco.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.216.251.37 Mon, 29 Apr 2024, 12:53:35



tura automatica (ACL 2000, Instrumentation Laboratory, Milano);
• dosaggio dei fattori non vitamina K-dipendenti: tutti (compreso il fattore VIII) erano nell'intervallo di normalità (80-120%, nella popolazione sana di controllo). Il dosaggio dei fattori non vitamina K-dipendenti è stato eseguito con la stessa metodica dei fattori vitamina K-dipendenti. L'ulteriore conferma della normalità del cofattore VIII è stata ottenuta mediante dosaggio della frazione antigenica di von Willebrand (Stago, Asmieres-sur-Seine, Francia) con metodica ELISA. Non è stato possibile eseguire il dosaggio del warfarin nel sangue.

## Discussione

Escluse le cause acquisite di ipersensibilità al warfarin, vari meccanismi potrebbero essere alla base dell'insolito decorso clinico descritto. Innanzitutto, il paziente potrebbe essere portatore di deficit genetico, quantitativo o, più verosimilmente, qualitativo, di uno o più fattori della coagulazione, come del resto ripetutamente descritto in letteratura per il fattore IX[4-6], con una frequenza nella popolazione generale dello 0.5%. Si tratterebbe cioè di una mutazione missenso, a causa della quale la quantità basale di un determinato fattore della coagulazione risulta normale o, al più, lievemente ridotta, ma tale in ogni caso da non provocare sanguinamento; le complicanze emorragiche invece si osservano in occasione di terapia con anticoagulanti orali.

Nel nostro caso, i fattori coinvolti potrebbero essere il II, il VII e il X, i cui livelli risultavano notevolmente più bassi di quelli, per esempio, della proteina C ed S (Tab. II); questa evidenza farebbe escludere un semplice effetto dose-dipendente, poiché in questo caso tutti i fattori vitamina K-dipendenti sarebbero diminuiti in modo simile. Il dosaggio dei fattori vitamina K-dipendenti, per motivi tecnici, non fu però eseguito al plateau di inibizione, ma dopo 5 giorni dalla sospensione del warfarin, quando la loro diversa emivita (di poche ore per il fattore VII e la proteina C, e di alcuni giorni per i fattori II, IX e X) poteva spiegare il basso valore di attività dei fattori II e X.

In secondo luogo, l'eccessiva anticoagulazione sarebbe da attribuire alla contemporanea somministrazione di amiodarone, il quale, come è noto, inibisce il metabolismo epatico del warfarin[7]; ma l'entità di questa inibizione, dimostrata sperimentalmente, non sembra tale da giustificare, da sola, un così notevole rialzo dell'INR, anche per la brevità della somministrazione dell'amiodarone e per il basso dosaggio usato. Tuttavia, l'amiodarone potrebbe aver potenziato l'azione del warfarin in un paziente con anomalie genetiche dei fattori della coagulazione o del metabolismo del warfarin.

In ultimo, il paziente potrebbe essere portatore di mutazione del gene codificante per il citocromo P450 CYP2C9, preposto al metabolismo del warfarin e di molti altri farmaci[1]. Di questo enzima epatico, che metabolizza soprattutto l'S-warfarin trasformandolo nel 6- e 7-idrossiderivato (entrambi inattivi), sono state descritte[8,9], oltre alla forma "selvaggia" CYP2C9*1, due varianti alleliche (CYP2C9*2 e CYP2C9*3) con attività rispettivamente del 12 e del 5% in confronto alla forma "selvaggia". Ciascuno di questi alleli differisce dalla forma normale per una singola sostituzione aminoacidica.

Dopo analisi genetica con la metodica della "polymerase chain reaction" (vedi Appendice)[10,11], il nostro paziente è risultato doppio eterozigote per le varianti alleliche mutanti (cioè con genotipo CYP2C9*2/*3); la frequenza di questo genotipo nella popolazione generale è ≤ 2%. L'insolita risposta alla terapia con warfarin è pertanto da attribuire ad un aumento del livello ematico del farmaco conseguente a ridotto catabolismo; si tratterebbe cioè di un sovradosaggio relativo del warfarin, e questo può spiegare facilmente i ridotti livelli di attività dei fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti descritti nella tabella II.

La frequenza degli alleli mutanti del citocromo P450, da soli o in associazione con l'allele "selvaggio", è stimata essere circa il 21% nella popolazione generale[3], ma relativamente bassa è la percentuale di pazienti che necessitano di terapia con warfarin nella popolazione generale. È perciò aperta la discussione sul rapporto costo-beneficio della tipizzazione genetica dei pazienti da sottoporre a terapia anticoagulante orale, specialmente quando si renda necessaria una dose di carico. Il caso descritto, oltre ad essere un esempio della difficoltà diagnostica nel distinguere tra cause primitive e secondarie di ipersensibilità al warfarin, dimostra chiaramente che, dal punto di vista strettamente clinico, la tipizzazione genetica sarebbe senz'altro utile per lo screening dei pazienti a rischio emorragico e dei loro familiari. Infatti, poiché il nostro paziente è portatore del genotipo CYP2C9*2/*3, anche i figli avranno almeno un allele mutante, e devono perciò essere considerati soggetti a rischio nel caso di un'eventuale terapia con anticoagulanti orali.

## Riassunto

Viene descritto il caso clinico di un uomo di 71 anni con scompenso cardiaco (III classe funzionale NYHA) trattato con warfarin sodico in seguito al riscontro di trombosi intraventricolare sinistra. Nonostante il dosaggio non eccessivo del farmaco, l'INR salì dopo pochi giorni a 11.68, e ritornò normale soltanto dopo 20 giorni di sospensione della terapia. Fu inoltre sorprendente l'assenza di emorragie maggiori o minori. La tipizzazione degli alleli del citocromo P450 CYP2C9, deputato al metabolismo del warfarin, dimostrò che il paziente era portatore, in doppia eterozigosi, di entrambi gli alleli mutanti (CYP2C9*2/*3), con conseguente ridotto catabolismo dell'S-warfarin ed eccessiva anticoagulazione.

*Parole chiave:* Anticoagulazione; Polimorfismo del CYP2C9; Warfarin.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.216.251.37 Mon, 29 Apr 2024, 12:53:35



## Appendice

*Estrazione ed analisi del DNA*

Il DNA è stato estratto dai leucociti del sangue periferico secondo i protocolli standard[10]. La tipizzazione dell'allele CYP2C9*2 è stata compiuta dopo digestione con l'endonucleasi Ava II come descritto in precedenza[11]. Per l'identificazione dell'allele CYP2C9*3 sono stati sintetizzati un primer spinto nel senso 5'-3' (5'-CAGCTAAAGTCCAGGAAGAGAT-3') e un oligonucleotide mutato invertito nel senso di lettura (5'-AGGCTGGTGGGGAGAAGCTC-3'), che inseriva all'interno del prodotto di amplificazione un sito per l'enzima Sml I. La "polymerase chain reaction" è stata eseguita in campioni di 50 μl di volume, in un sequenziatore termico tipo Perkin Elmer-Cetus. Ogni campione conteneva 0.5 μg di DNA genomico, 15 pmoli di ciascun primer, 100 mM di dNTP, 10 mM di Tris HCl a pH 8.3, 50 mM di KCl, 1.5 mM di $MgCl_2$, e 1 U di polimerasi Taq termostabile. Sono stati compiuti 30 cicli consistenti di passaggi a 95°C per 1 min, a 60°C per 50 s e a 72°C per 1.5 min. Poi 15 μl dei prodotti di amplificazione sono stati digeriti per 5 ore a 37°C con 2 U dell'enzima di restrizione Sml I. I frammenti sono stati frazionati mediante elettroforesi in gel di agarosio al 3% e visualizzati con luce UV.

## Bibliografia


1. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P450 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. Br J Clin Pharmacol 1998; 45: 525-38.
2. Federazione Centri Sorveglianza Anticoagulati (FCSA). Nuova guida alla terapia con anticoagulanti orali. Bologna, 1997.
3. Mannucci PM. Genetic control of anticoagulation. Lancet 1999; 353: 688-9.
4. Chu K, Wu SM, Stanley T, Stafford DW, High KA. A mutation in the propeptide of factor IX leads to warfarin sensitivity by a novel mechanism. J Clin Invest 1996; 98: 1619-25.
5. Oldenburg J, Quenzel EM, Harbrecht U, et al. Missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide: an insignificant variant in normal life but a decisive cause of bleeding during oral anticoagulant therapy. Br J Haematol 1997; 98: 240-4.
6. Peters J, Luddington R, Brown K, Baglin C, Baglin T. Should patients starting anticoagulant therapy be screened for missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide? Br J Haematol 1997; 99: 467-8.
7. Heimark LD, Wienkers L, Kunze K, et al. The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. Clin Pharmacol Ther 1992; 51: 398-407.
8. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. Lancet 1999; 353: 717-9.
9. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. Blood 2000; 96: 1816-9.
10. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, et al. Raised plasma fibrinogen concentration in subjects attending a metabolic ward. Relation to family history and vascular risk factors. Thromb Haemost 1995; 73: 579-83.
11. Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. Pharmacogenetics 1996; 6: 429-39.