



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Apixaban en la prevención de complicaciones trombóticas: Mecanismos adicionales de su acción antihemostática

Lluís Pujadas Mestres

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENTO DE HEMOSTASIA Y HEMOTERAPIA
HOSPITAL CLINIC DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Apixaban en la prevención de complicaciones trombóticas:
Mecanismos adicionales de su acción antihemostática**

Lluís Pujadas Mestre

Tesis Doctoral

Barcelona, Abril 2017

**APIXABAN EN LA PREVENCIÓN DE COMPLICACIONES
TROMBÓTICAS: MECANISMOS ADICIONALES DE SU
ACCIÓN ANTIHEMOSTÁTICA**

Tesis Doctoral

Lluís Pujadas Mestres

TESIS DOCTORAL

**APIXABAN EN LA PREVENCIÓN DE COMPLICACIONES
TROMBÓTICAS: MECANISMOS ADICIONALES DE SU
ACCIÓN ANTIHEMOSTÁTICA**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina

Realizada por:

Lluís Pujadas Mestres

Para optar al grado académico de Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado: **Medicina**

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Ginés Escolar y de la Dra. Irene López Vilchez, en el Servicio de Hemoterapia y Hemostasia del Hospital Clínic de Barcelona.

Lluís Pujadas Mestres

Ginés Escolar

Irene López Vilchez

Barcelona, 24 de Abril de 2017

A mi Lola, y a mi futura hija Mia,
por ser mis mejores regalos.

A Carla,
la mujer de mi vida,
por escucharme, aguantarme y animarme en todo momento.

A mis padres,
por apoyarme siempre.

INFORME DE LOS DIRECTORES



El **Dr. Ginés ESCOLAR ALBALADEJO**, especialista sénior del Servicio de Hemostasia y Hemoterapia del Hospital Clínic de Barcelona, y profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona; y la **Dra. Irene LÓPEZ VILCHEZ**, investigadora Post-Doc en el Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS),

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral "**Apixaban en la prevención de complicaciones trombóticas: Mecanismos adicionales de su acción antihemostática**" presentada por **Lluís PUJADAS MESTRES** para optar al Grado de **Doctor en Medicina**, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Asimismo, la presente tesis doctoral es presentada como formato clásico e incluye dos trabajos publicados en revistas indexadas en las que el doctorando figura como primer autor, y material adicional sobre optimización de metodología posteriormente aplicada en una de las publicaciones mencionadas.

El doctorando ha contribuido en la obtención de muestras, diseño y ejecución de los experimentos, obtención de los resultados y su correspondiente análisis estadístico. A su vez ha participado de forma importante en la escritura y preparación de los artículos incluidos en la presente tesis doctoral.

Y así lo hacen constar bajo todos los efectos oportunos en Barcelona a 24 de abril de 2017.

Dr. Ginés ESCOLAR ALBALADEJO

Dra. Irene LÓPEZ VILCHEZ

INFORME DE LOS DIRECTORES	13
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	23
JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA UNITARIO	29
1. HEMOSTASIA PRIMARIA: LAS PLAQUETAS	31
2. HEMOSTASIA SECUNDARIA: LA COAGULACIÓN	32
2.1. Vía clásica de la coagulación.....	33
2.2. Modelo “Celular” de la Coagulación.....	35
2.3. Comportamiento reológico de la sangre.....	37
3. RIESGO CARDIOVASCULAR	39
3.1. La fibrilación auricular.....	39
3.1.1. Epidemiología de la fibrilación auricular.....	39
3.1.2. Fisiopatología de la fibrilación auricular.....	40
3.1.3. Estratificación del riesgo tromboembólico y hemorrágico en la FA.....	43
3.2. La patología aterosclerótica y el síndrome coronario agudo.....	44
3.2.1. Aterotrombosis.....	44
3.2.2. Epidemiología del síndrome coronario agudo.....	47
3.2.3. Fisiopatología del síndrome coronario agudo.....	48
4. ANTICOAGULANTES DE ACCIÓN DIRECTA Y APIXABAN	51
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
RESULTADOS	75
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO	149

ABREVIATURAS

En esta tesis se han utilizado algunas abreviaturas intentando respetar el término en español. Sin embargo, en ocasiones se ha recurrido a la abreviatura anglosajona de uso mucho más extendido. Abajo se listan todas las abreviaturas que se han utilizado junto a su definición.

5-HT: Serotonina
A10: Amplitud de coágulo a 10 minutos
AAS: Aspirina (Ácido Acetilsalicílico)
ABC/AUC: Área Bajo la Curva
ACOD: Anticoagulantes Orales de Acción Directa
ACV: Accidente Cerebrovascular
ADP: Adenosina Difosfato
AINE: Antiinflamatorio No Esteroideo
AIT: Accidente Isquémico Transitorio
AO: Anticoagulante Oral
ATP: Adenosina Trifosfato
AVK: Antagonista de la Vitamina K
BID: Dos veces al día (*Bis In Die*)
C_{max}: Concentración Máxima
C_{min}: Concentración Mínima
DIOCLES: Descripción de la Cardiopatía Isquémica en Territorio Español
EAC: Enfermedad Arterial Coronaria
ECG: Electrocardiograma
EMA: European Medicines Agency
EP: Embolia Pulmonar
ERC: Enfermedad Renal Crónica
ESC: Sociedad Europea de Cardiología
FA: Fibrilación Auricular
FANV: Fibrilación Auricular No Valvular
FDA: U.S. *Food and Drug Administration*
FII/FIIa: Protrombina/trombina
FIX/FIXa: Factor de coagulación IX/IX activado
FNG: Fibrinógeno
FT: Factor Tisular
FV/FVa: Factor de coagulación V/V activado
FVII/FVIIa: Factor de coagulación VII/VII activado
FVIII/FVIIIa: Factor de coagulación VIII/VIII activado
FVW: Factor de von Willebrand
FX/FXa: Factor de coagulación X/X activado
FXI: Factor de coagulación XI
FXII: Factor de coagulación XII
FXIII: Factor XIII de coagulación
GP: Glicoproteína
HBPM: Heparina de Bajo Peso Molecular
HNF: Heparina No Fraccionada

HR: Hazard Ratio
i.v.: Intravenoso
ICP: Intervención Coronaria Percutánea
IM: Infarto de Miocardio
IMCEST: Infarto de Miocardio Con Elevación del ST
IMSEST: Infarto de Miocardio Sin Elevación del ST
INR: International Normalized Ratio
LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad
MACE: Eventos Adversos cardiacos Mayores
min: Minutos
NACO: Nuevos Anticoagulantes Orales
NO: Óxido Nítrico
NS: No-significativo
OAI: Orejuela de la Aurícula Izquierda
OR: Odds Ratio
P2Y₁₂: Inhibidor del receptor plaquetario
PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno
PBS: Tampón Fosfato Salino
PCR: Proteína C-Reactiva
Plt: Plaquetas
PPP: Plasma pobre en plaquetas
PRP: Plasma rico en plaquetas
QD: Cada Día (*Quaque Die*)
rFVIIa: Factor VII activado recombinante
RR: Riesgo Relativo
RRR: Reducción del Riesgo Relativo
s.c.: Subcutáneo
SCA: Síndrome Coronario Agudo
SCACEST: SCA con elevación del segmento ST
SCASEST: SCA sin elevación del segmento ST
SCASEST: Síndrome Coronario Agudo Sin Elevación del ST
SEM: Error estándar de la media
TC: Tiempo de Coagulación
TEM: Tromboelastometría
TEV: Tromboembolismo venoso
TFC: Tiempo de Formación del Coágulo
TFGe: Tasa de Filtrado Glomerular Estimado
TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor
TID: Tres veces al día (*Ter In Die*)
TP: Tiempo de protrombina
TT: Tiempo de trombina
TTPa: Tiempo de tromboplastina parcial activado
TVP: Trombosis Venosa Profunda
TXA2: Tromboxano A2
Veh: Solución Vehículo

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular. Clásicamente se ha dividido en hemostasia primaria, en la que participan fundamentalmente las plaquetas a través de los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación para formar el tapón hemostático plaquetario inicial, y la fase de coagulación sanguínea (también conocida como hemostasia secundaria). La deficiencia o anomalía del sistema hemostático conlleva una tendencia hemorrágica, mientras que una activación excesiva puede resultar en trombosis ocluyendo el vaso (1) (2).

En la década de 1960, dos grupos propusieron paralelamente un modelo de coagulación en forma de “cascada” enzimática, compuesta por una serie de etapas secuenciales. En ambos modelos, la activación de un factor de coagulación activa al siguiente, con el objetivo de generar el enzima activo trombina (factor IIa), el cual convierte una proteína soluble del plasma, el fibrinógeno (FNG), en una proteína insoluble, la fibrina, componente estructural del coágulo (3) (4). Según el modelo clásico de la coagulación existen dos vías de activación, la intrínseca y la extrínseca, iniciadas por el factor XII y el complejo factor tisular/factor VII respectivamente, convergiendo en una vía común a nivel del factor X activo (FXa). El complejo protrombinasa, compuesto por el FXa, Ca^{2+} y factor Va, a nivel de superficies fosfolipídicas favorecería la generación de trombina y la formación de fibrina (5) (6) (7).

Sin embargo, este modelo no contemplaba la participación de las plaquetas ni de otros elementos celulares de la sangre. Estudios más recientes han demostrado la importancia de los componentes celulares en el proceso de coagulación, y especialmente el papel de las plaquetas. La teoría celular de la coagulación plantea una nueva visión de la misma en la que participan elementos celulares de la sangre; ésta se produce en tres etapas interrelacionadas: iniciación, amplificación y propagación (8) (9). Este modelo contempla una vía única y la focalización del proceso en las superficies celulares (5) (6). Brevemente, la coagulación fisiológica depende de la exposición de FT tanto a nivel subendotelial como expuesto por distintas células sanguíneas, que interacciona con el factor VIIa, y del ensamblaje de los complejos de la coagulación a nivel de superficies celulares como las plaquetas, lo que favorece la formación de trombina a nivel local y la generación de un coágulo estable de fibrina.

En situaciones patológicas con elevado riesgo cardiovascular encontramos una activación incrementada de la hemostasia primaria o de los mecanismos de la coagulación; y las aproximaciones terapéuticas para disminuir estas activaciones son diferentes. Los tratamientos anticoagulantes convencionales pueden reducir significativamente el riesgo de trombosis en el territorio venoso, y el ictus o embolismo sistémico en pacientes con fibrilación auricular (FA). Los anticoagulantes orales clásicos basados en el antagonismo de la vitamina K (AVK) han demostrado eficacia en la prevención de complicaciones tromboembólicas en este contexto clínico. Desafortunadamente, los AVK tienen limitaciones inherentes, incluyendo retraso en el inicio de su acción, estrecho rango terapéutico, la variabilidad de su respuesta, la necesidad de control continuado y numerosas interacciones con otros medicamentos y alimentos. La frecuencia de ictus relacionado con la FA aumenta con la edad, por ello las guías de las diferentes sociedades científicas advierten de que el riesgo de sangrado en un paciente debe cuantificarse antes de la exposición a la anticoagulación y sopesar frente el riesgo de ictus con y sin anticoagulación. A pesar de los esfuerzos para una correcta evaluación clínica de la relación riesgo/beneficio, no todos los pacientes con FA con riesgo tromboembólico reciben el tratamiento anticoagulante adecuado (10). Esto llevó a considerar nuevas estrategias para optimizar la prevención del ictus isquémico embólico, a menudo mortal o incapacitante, causada por FA. En la última década, el desarrollo de los nuevos anticoagulantes orales, actualmente también conocidos como anticoagulantes orales de acción directa (ACODs), con mecanismos de acción más específicos, amplio rango terapéutico y con menos interacciones farmacológicas podrían suponer una nueva opción terapéutica para estos pacientes. Aun así, en algún caso estos fármacos podrían producir hemorragia y, por consiguiente, sería necesario la determinación y control de su actividad anticoagulante, además de la investigación sobre la reversión de dicho efecto en caso necesario (11). Los ACODs se clasifican en dos grupos dependiendo de su mecanismo de acción, dirigidos a la inhibición directa del FIIa (trombina), como ximelagatran y dabigatran etexilato (Pradaxa®); o del FXa, como rivaroxaban (Xarelto®), apixaban (Eliquis®), y edoxaban (Lixiana®) (12).

Apixaban es un anticoagulante oral con una acción inhibitoria directa, específica y reversible del FXa. Estudios clínicos previos, realizados con miles de pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor, han demostrado un alto perfil de seguridad y

eficacia en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa frente a enoxaparina. Los resultados de dos grandes ensayos clínicos en fase 3 (ARISTOTLE y AVERROES) (13) (14) han demostrado la eficacia y seguridad de apixaban en comparación con aspirina (ácido acetilsalicílico; AAS) o warfarina, respectivamente, en la prevención del ictus y embolia sistémica en pacientes con FA. Además, en pacientes no aptos para el tratamiento con AVK, apixaban mostró más eficacia que AAS en la prevención del ictus con similares niveles de seguridad con respecto a los riesgos de sangrado. La eficacia y seguridad de apixaban en los últimos ensayos clínicos fue consistente a través de varios análisis de subgrupos (13) (14).

Asimismo, los agentes antiplaquetarios y tratamientos anticoagulantes, tales como heparinas, han demostrado éxito clínico en disminuir la formación de coágulos sanguíneos en el sistema arterial y venoso, a pesar de ello todavía se producen un número significativo de eventos recurrentes. Los ACODs pueden considerarse igualmente eficaces que la warfarina, pero más seguros y más fáciles de usar, en la prevención de ictus debida a la FA, y el tromboembolismo venoso. A pesar de estas ventajas, hay información limitada sobre los efectos de los ACODs, como apixaban, en el marco del síndrome coronario agudo (SCA); y la posible sinergia de un tratamiento combinado antiplaquetario más anticoagulante no se ha investigado en detalle (15). La actividad inhibidora de apixaban sobre la generación de trombina debe ser considerada como una ventaja importante; sin embargo, su efecto sobre la actividad procoagulante mediada por plaquetas no se ha explorado todavía.

En resumen, la activación plaquetaria, la generación local de trombina y la formación de fibrina son tres elementos clave que contribuyen a la formación de trombos oclusivos en los territorios arteriales. Los mecanismos de acción de los ACODs, como apixaban, apoyan su potencial uso terapéutico en la prevención de complicaciones trombóticas en el sistema vascular arterial, sin embargo los efectos de estos agentes sobre la activación y agregación plaquetaria no se han investigado en detalle.

JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA UNITARIO

1. HEMOSTASIA PRIMARIA: LAS PLAQUETAS

La hemostasia es el conjunto de procesos que tiene el organismo que permite que la sangre circule en estado fluido por los vasos. La hemostasia también actúa cuando se produce un daño vascular permitiendo la formación de un tapón hemostático para detener la hemorragia y posteriormente reparar el daño. Si el equilibrio se rompe hacia un defecto en la hemostasia suelen darse complicaciones de tipo hemorrágico, mientras que si se decanta hacia un exceso, las complicaciones son de tipo trombótico.

Las plaquetas son corpúsculos celulares, implicadas en el mantenimiento de la hemostasia fisiológica a través de la formación de un tapón plaquetario, en un proceso conocido como hemostasia primaria. El primer contacto entre la plaquetas y la superficie vascular dañada está mediado por la interacción entre la glicoproteína (GP) Ib de la superficie plaquetaria y el factor de von Willebrand (FVW) expuesto en el subendotelio (16). Esta interacción permite a las plaquetas circulantes detectar las zonas dañadas, activarse y adherirse a la superficie para cubrir el máximo de superficie.

La activación plaquetaria induce cambios en el citoesqueleto plaquetario, se forman pseudópodos y se despliegan las membranas del sistema canalicular abierto para cubrir el máximo de superficie (17). Las plaquetas no tienen núcleo, pero poseen en su interior gránulos alfa (derivados del megacariocito) donde entre otros se almacena FVW, factor V (FV) de la coagulación, factor XIII (FXIII), FNG, así como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) (17) (18). Además, en su interior también se encuentran cuerpos densos en los que se almacena adenosina difosfato (ADP; procedente de la adenosina trifosfato (ATP) que es consumido por la plaqueta), calcio y serotonina (5-HT) (17) (Figura 1). La activación de las plaquetas también implica centralización de estos gránulos, de manera que se produce una fusión de membranas con las del sistema canalicular abierto, permitiendo la liberación de su contenido a la circulación (19) (20). A su vez, se produce ácido araquidónico dentro de la plaqueta que es transformado en tromboxano A₂ (TXA₂) a través de la ciclooxigenasa (21). El TXA₂ es un vasoconstrictor, al igual que la 5-HT, y además estimula la liberación de ADP promoviendo la agregación plaquetaria. Durante la activación plaquetaria, se exponen fosfolípidos aniónicos en la superficie plaquetar tras un mecanismo conocido como “*flip-flop*”. Estos fosfolípidos harán de catalizadores de la coagulación, ya que

proporcionan la superficie adecuada sobre la que se ensamblen los complejos enzimáticos de la coagulación. A menudo, la exposición de estos fosfolípidos es conocida como expresión de actividad procoagulante (22).

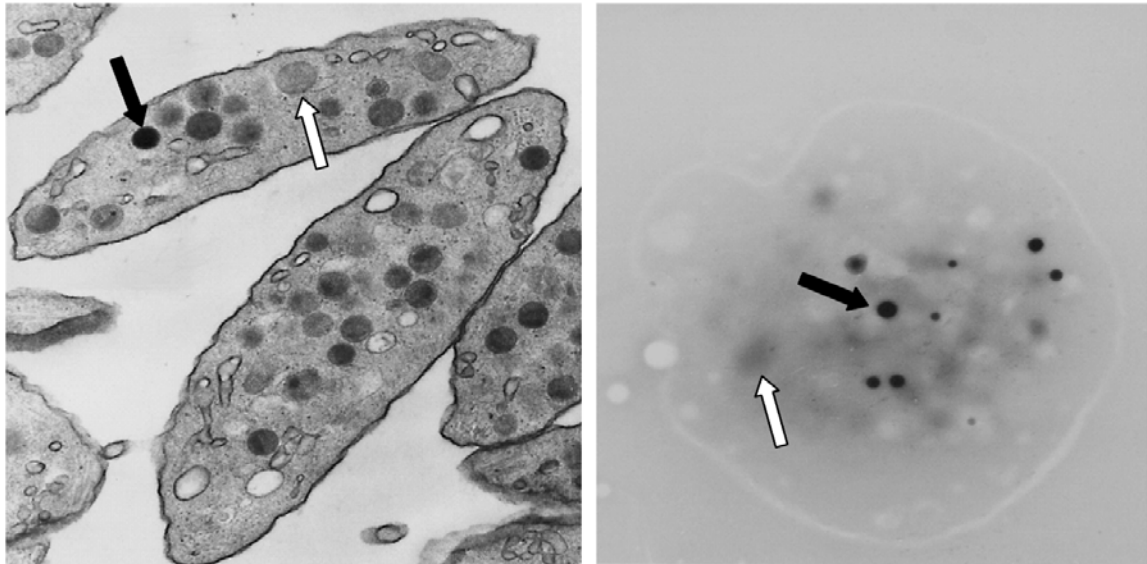


Figura 1. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión mostrando plaquetas por distintas técnicas. En ambas imágenes se puede apreciar que las plaquetas son células no nucleadas, aunque en su interior sí poseen gránulos alfa (flecha blanca), y también cuerpos densos (flecha negra) (23).

Tras la reacción de liberación, se expresa en la superficie de la plaqueta activada GP IIb-IIIa conformacionalmente activa, que permite la agregación de las plaquetas entre sí. Esta unión utiliza como puente molecular FNG y FVW. El resultado es la formación de un tapón hemostático primario que posteriormente, tras la activación de los mecanismos de la coagulación, se verá consolidado por una malla de fibrina (Figura 2). Este proceso se conoce como hemostasia secundaria. En situaciones patológicas donde se da una excesiva activación plaquetaria, los mismos mecanismos plaquetarios pueden resultar en la aparición de episodios trombóticos.

2. HEMOSTASIA SECUNDARIA: LA COAGULACIÓN

La cascada de la coagulación tiene como catalizador los fosfolípidos aniónicos de la superficie de las plaquetas activadas. El objetivo es la generación de trombina que permite formar de la malla de fibrina que establezca el tapón hemostático (24). A su vez, la trombina generada también permitirá la activación de nuevas plaquetas.

Es conocido que la exposición de factor tisular (FT) y colágeno tras la disrupción de las placas ateroscleróticas juegan un papel crítico en las complicaciones isquémicas causadas por las plaquetas (figura 2).

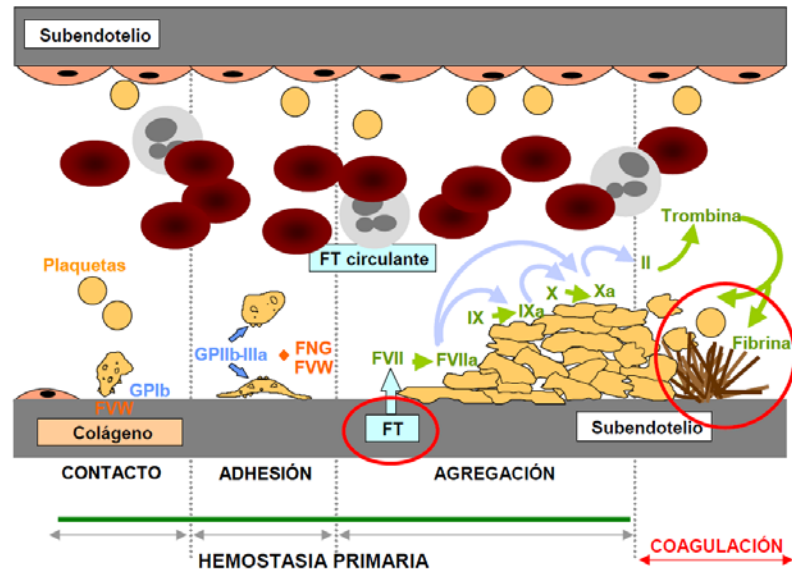


Figura 2. Fases de la hemostasia primaria (contacto, adhesión y agregación) y hemostasia secundaria (activación de la coagulación) tras una lesión vascular.

2.1. Vía clásica de la coagulación

Tradicionalmente, la coagulación se ha dividido en dos vías: intrínseca y extrínseca. Ambas vías confluyen en la activación del factor X (FX) de la coagulación (25) (26) (27).

La vía intrínseca se inicia con la fase de contacto tras ponerse en contacto los factores de la coagulación con el endotelio dañado. El factor XII (FXII) se activa parcialmente y actúa sobre la precalicreína formando calicreína. Ésta junto al quininógeno de alto peso molecular amplifica la activación del FXII, el cual actúa sobre el factor XI (FXI) produciendo FXIa. Y éste activa al factor IX (FIX), que activará al FX tras interactuar con el FVIIIa (Figura 3).

La vía extrínseca se inicia tras la unión del FVIIa al principal iniciador de la coagulación, el FT, el cual juega un papel crítico en la hemostasia (28). De este modo, se forma el complejo FT-FVIIa en el que es necesaria la presencia de calcio (Ca^{2+}), constituyendo en condiciones fisiológicas el inicio de la coagulación. Una vez formado el complejo FT-FVIIa, la cascada de la coagulación puede seguir dos caminos: la activación

del FIX o la activación directa del FX. El FXa también es capaz de activar al FIX, acelerando el proceso de formación del FIXa. En condiciones normales, el complejo FT-FVIIa es responsable de iniciar la generación de FXa, el cual genera suficiente trombina como para inducir la agregación local de las plaquetas y la activación de los cofactores FV y FVIII. Sin embargo, el FXa producido por el complejo FT-FVIIa es insuficiente para sostener la hemostasia ya que su actividad está controlada por el inhibidor de la vía del FT (TFPI: *Tissue Factor Pathway Inhibitor*). La acción de los factores FIXa y FVIIIa es entonces necesaria para amplificar y mantener la hemostasia (Figura 3).

El FXa, formado a través de cualquiera de las dos vías mencionadas, forma, a su vez, un complejo con el FVa (complejo protrombinasa) capaz de transformar el FII (protrombina) en FIIa (trombina). En una última etapa, la trombina abandona la superficie celular para transformar el FNG en fibrina (Figura 3).

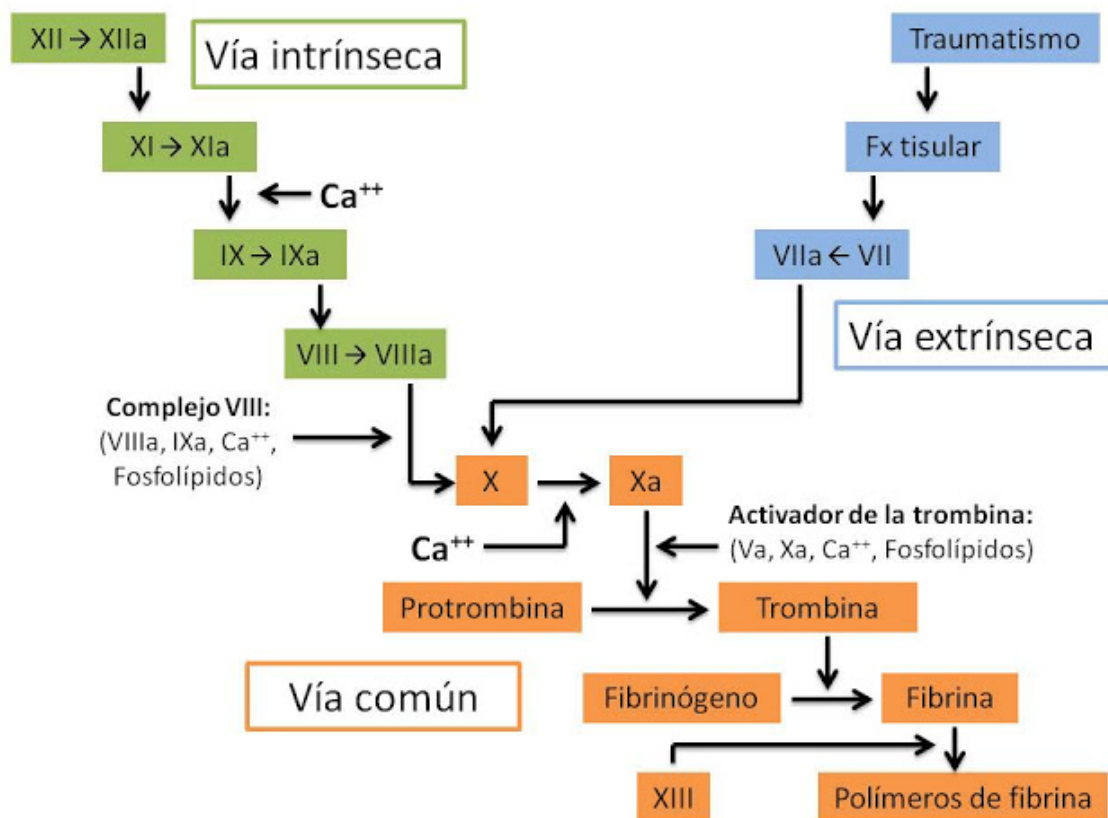


Figura 3. Fases de la hemostasia secundaria (vía intrínseca y extrínseca).

El factor V puede ser activado por el propio FXa, por ciertas proteasas de la matriz extracelular o puede ser liberado directamente por las plaquetas tras el contacto

con el colágeno u otros componentes de la matriz extracelular. Normalmente el FXa permanece unido a la membrana celular para protegerse de la degradación. En caso de producirse su disociación y pasar al torrente sanguíneo, es rápidamente inhibido en el plasma por inhibidores de la ruta de los factores tisulares o por antitrombina, evitando así que sea activo fuera de la zona de la lesión. De esta forma, la presencia de inhibidores focaliza y limita eficientemente la actividad del FXa a las superficies celulares donde se produce la lesión. El factor IXa puede moverse a través del plasma desde la célula en que se origina hacia una plaqueta vecina u otra superficie celular, ya que es inhibido mucho más lentamente por la antitrombina.

En la fase final de la coagulación, el factor XIII se activa gracias a la presencia de trombina y calcio. El factor XIII permite que las moléculas de fibrina individuales se conecten entre sí mediante enlaces covalentes y formen una red de fibrina estable que permite la estabilización del tapón plaquetario. Los filamentos de fibrina se vuelven insolubles al entrelazarse con las plaquetas en el tapón hemostático (29).

En condiciones fisiológicas, la coagulación y la fibrinólisis están minuciosamente reguladas por diferentes sustratos, activadores, inhibidores, cofactores y receptores. La activación del sistema fibrinolítico es esencial para eliminar depósitos intravasculares de fibrina resultantes de la activación fisiológica o patológica del sistema de coagulación. La fibrinólisis es un proceso compuesto por una serie de activadores e inhibidores que regulan la conversión del proenzima circulante plasminógeno en el enzima activo plasmina. La producción de plasmina libre en la superficie del trombo conduce a la lisis de la fibrina y esto es muy importante para el mantenimiento de la permeabilidad vascular (30).

2.2. Modelo “Celular” de la Coagulación

El modelo de coagulación clásica propuesto hace más de 40 años, separa las fases celular y humoral de la coagulación. Considera que el proceso de hemostasia se consigue a través de la activación secuencial de enzimas efectoras en dos vías independientes (la extrínseca y la intrínseca), como una “cascada” enzimática compuesta por una serie de etapas secuenciales (3) (4). Dicho modelo (vía clásica), no contempla la participación de las plaquetas ni de otras superficies celulares.

Actualmente se conoce que la hemostasia no es posible sin el concurso de las plaquetas. Además, el FT es una proteína que está presente en la membrana de diversas células, como monocitos, y hoy sabemos que diferentes células expresan proteínas procoagulantes y anticoagulantes, además de receptores para diversos componentes de la hemostasia, lo que ha supuesto un nuevo paradigma para explicar las reacciones que tienen lugar durante el proceso hemostático.

En un intento por abordar el fenómeno de la hemostasia desde otra perspectiva, se han desarrollado modelos experimentales y conceptuales para probar las hipótesis en un modelo bioquímico *ex vivo*, y permitir un mejor entendimiento de cómo el sistema funciona *in vivo*. El más logrado de éstos es el modelo celular de la coagulación desarrollado por Hoffman y cols (5). El aspecto más importante del modelo es considerar a las células como elementos esenciales en el proceso de formación del coágulo y demostrar que las superficies celulares poseen características especiales capaces de dirigir el proceso hemostático. La nueva teoría rompe así con el paradigma del modelo tradicional, según el cual, el papel de la célula era únicamente el de ofrecer una superficie portadora de fosfatidilserina donde los complejos procoagulantes podrían ser armados. Esta nueva teoría reemplaza la tradicional hipótesis de las cascadas y enfatiza en las células como elementos esenciales capaces de dirigir el proceso hemostático en tres fases interrelacionadas: iniciación, amplificación y propagación (5) (Figura 4).

La *fase de iniciación*, que tiene lugar a nivel de células portadoras de FT, como fibroblastos o monocitos, y conlleva la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina, suficientes para iniciar el proceso. La *fase de amplificación* se traslada a la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada y acumulan factores y cofactores en su superficie, permitiendo el ensamblaje necesario para que tengan lugar las reacciones enzimáticas. Finalmente, en la *fase de propagación*, las proteasas se combinan con los cofactores en la superficie plaquetaria, promoviendo la generación de grandes cantidades de trombina que favorecen la formación de fibrina y su ulterior polimerización para constituir un coágulo estable (8) (9) (32) (33) (34).

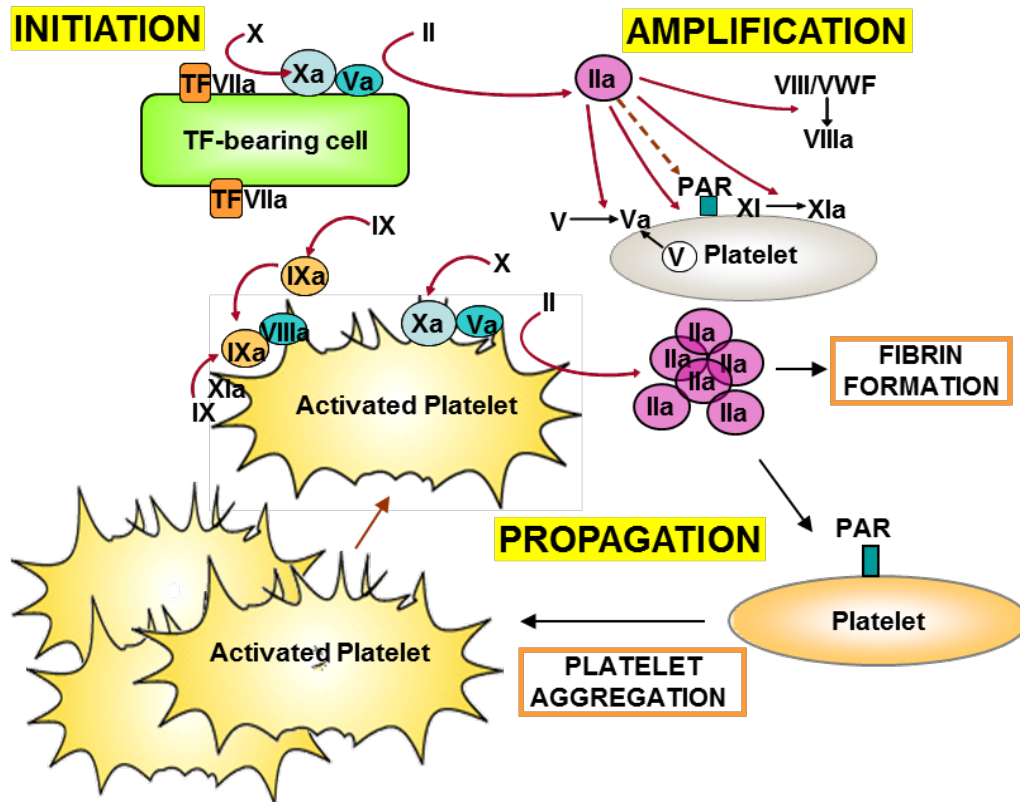


Figura 4. Esquema del modelo celular de la coagulación. Adaptación de Monroe, DM et al. ATVB. 2002. (31)

2.3. Comportamiento reológico de la sangre

La reología es el estudio de los principios físicos que regulan el movimiento de los fluidos. La sangre como fluido biológico también presenta un comportamiento reológico cuyo estudio se denomina hemoreología. La reología de la sangre es compleja y está influenciada por diversos factores como son: la viscosidad del plasma, el índice de cizalladura, el hematocrito, el nivel de agregación de eritrocitos y su deformabilidad (35). Una consecuencia de este comportamiento es que las células sanguíneas no se distribuyen de forma homogénea en todo el vaso. En circulación, las plaquetas, por ser células de menor tamaño, son empujadas por células de mayor tamaño (mayoritariamente glóbulos rojos) hacia la pared vascular. Este fenómeno hace que la concentración plaquetaria cerca de la pared vascular sea mayor que la medida en una alícuota de sangre en condiciones estáticas donde se reparten de forma homogénea. La concentración plaquetaria cerca de la pared vascular aumenta con el hematocrito, con el tamaño de los glóbulos rojos y con el índice de cizalladura del vaso (35) (36) (37). Sin

embargo, es importante que las plaquetas circulen lo más próximas a la pared del vaso, puesto que es ahí donde ejercen su función reconociendo cualquier lesión vascular.

En la mayoría de los vasos el flujo sanguíneo puede ser considerado un flujo laminar, en el que las capas circulantes del centro lo hacen a una velocidad mayor que las capas de la periferia más cercanas a la pared vascular. Un parámetro clave en el flujo laminar que tiene un impacto importante en la trombosis es el índice de cizalladura (38) (39). El índice de cizalladura por definición es el índice de cambio de la velocidad a la que una capa de fluido pasa sobre otra capa adyacente paralela. A lo largo del árbol vascular en función del diámetro del vaso y de su localización, el índice de cizalladura es variable (40). Esta variación tiene su repercusión en el tipo de fenómenos que se pueden observar en cada zona (figura 5).

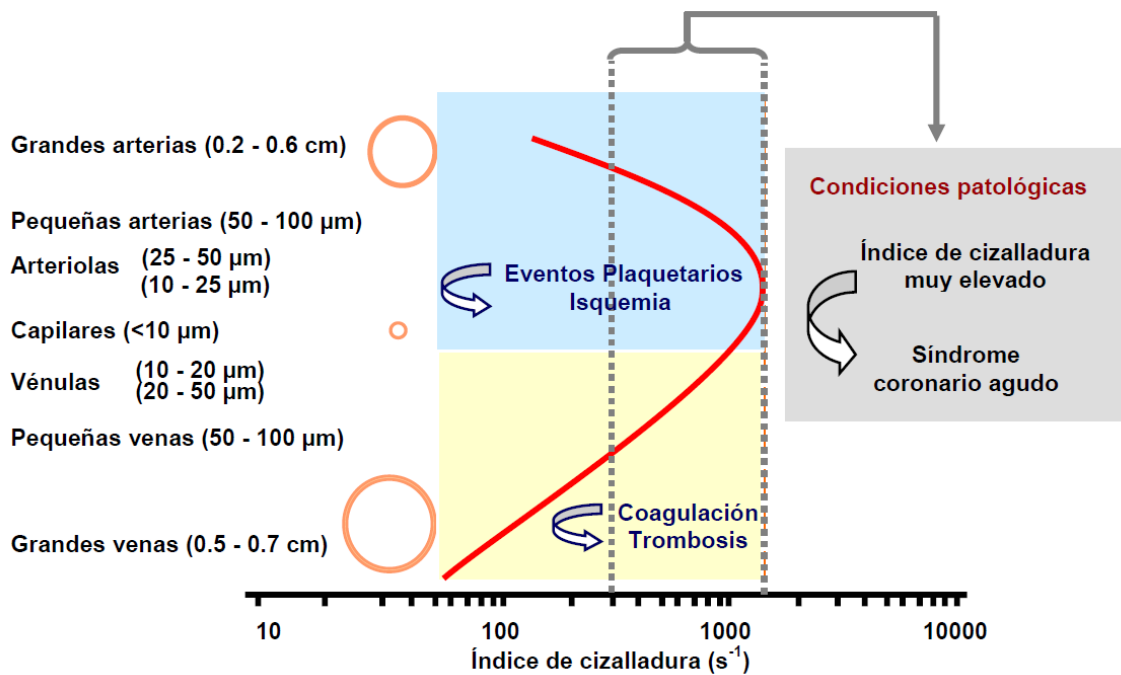


Figura 5. Esquema que representa la variación del índice de cizalladura en función del diámetro del vaso. **Adaptación de Baumgartner HR, Microvasc Res. 1973. (40)**

En el recorrido mayoritariamente arterial, donde se encuentran los mayores índices de cizalladura, predominarán los eventos mediados por las plaquetas lo que puede favorecer las complicaciones de tipo isquémico. Mientras que en el territorio venoso, donde se encuentran los índices de cizalladura menores, predominarán los mecanismos de la coagulación favoreciendo la deposición y formación de la malla de

fibrina. En condiciones patológicas donde hay una disminución del lumen del vaso, como sucedería por la presencia de una placa de ateroma, el índice de cizalladura alcanzado es muy elevado y podría dar lugar a un SCA (40).

La reología también tiene su impacto en las lesiones ateroscleróticas, que suelen desarrollarse normalmente en regiones vasculares donde hay bifurcaciones o curvas a nivel de las arterias. Una vez presente la lesión aterosclerótica se generan perfiles de flujo complejos que difieren bastante del flujo laminar uniforme (38) (39), y que aceleran la progresión de la aterogénesis (41) (Figura 6).

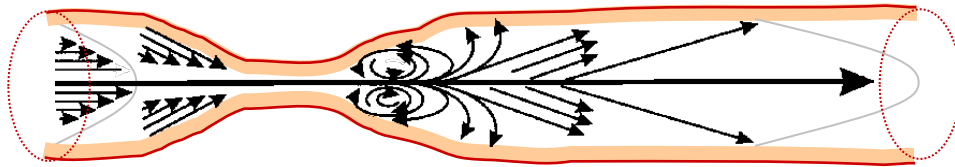


Figura 6. Complejidad de las alteraciones en el flujo de la sangre en el tramo de una arteria estenosada. **Adaptación de Nesbitt WS, et al. J Mol Med. 2006 (41)**

3. RIESGO CARDIOVASCULAR

La FA y el SCA son dos situaciones patológicas con elevado riesgo cardiovascular.

3.1. La fibrilación auricular

3.1.1. Epidemiología de la fibrilación auricular

La FA es un trastorno del ritmo cardíaco (o arritmia) que se caracteriza por una activación irregular, rápida y desorganizada de las aurículas cardíacas. La mayoría de los estudios epidemiológicos coinciden en situar la prevalencia global de la FA en torno al 1% (42) (43). La FA es la arritmia más frecuente en la práctica clínica y se estima que afecta a 4,5 millones de europeos (unas 670.000 personas en España) y 2,3 millones de estadounidenses (44). Esto quiere decir que aproximadamente uno de cada cuatro varones y mujeres mayores de 40 a 55 años sin FA padecerán esta enfermedad en el transcurso del resto de sus vidas (45) (46). La FA es especialmente frecuente en los

ancianos y el número de casos aumenta a medida que envejece la población. La prevalencia ajustada por edad de la FA muestra una tendencia al aumento (42) (47). A modo de ejemplo, en el Reino Unido la prevalencia de la FA activa en la base de datos de atención primaria DINLINK aumentó entre 1994 y 2003 desde el 0,78% hasta el 1,31% en los varones y desde el 0,79% hasta el 1,15% en las mujeres (47). Este aumento se debió principalmente al crecimiento de la prevalencia en los ancianos. En los Estados Unidos, los resultados del estudio ATRIA sugieren que el número de afectados por la FA se multiplicará por 2,5 entre 2001 y 2050. Se estima que, para entonces, el 53% de los afectados por la FA tendrá una edad ≥ 80 años (42).

La FA favorece la formación de coágulos de sangre en el corazón, que podrían desplazarse al cerebro y provocar un ictus isquémico, el tipo de ictus más frecuente (48). De hecho, la FA multiplica aproximadamente por cinco el riesgo de padecer un ictus y origina entre el 15% y el 20% de los ictus isquémicos (48) (49). Es más, las probabilidades de que el ictus sea incapacitante, recurrente o incluso mortal aumentan en los ictus provocados por la FA (50) (51) (52). La FA conlleva un coste económico considerable, derivado principalmente de la atención hospitalaria, los procedimientos intervencionistas y la incapacidad laboral. Se estima que el coste total del tratamiento y la incapacidad laboral derivada de la FA en cinco países europeos (España, Grecia, Holanda, Italia y Polonia) fue de 6.200 millones de euros en 2006 (53).

3.1.2. Fisiopatología de la fibrilación auricular

En la FA, desaparece la coordinación entre los miocitos auriculares, que se contraen de forma independiente. Como consecuencia, el latido auricular se acelera y se hace irregular. La FA conlleva una serie de consecuencias adversas: 1) Las aurículas dejan de bombear adecuadamente la sangre, que tiende a estancarse en las aurículas (estasis sanguínea). Esto favorece la formación de coágulos de sangre y constituye la principal causa de la asociación entre la FA y el ictus; 2) Las aurículas pierden su capacidad de bombeo y la eficiencia cardíaca general se resiente, sobre todo en los pacientes con una cardiopatía concomitante; 3) La elevada frecuencia auricular induce la aceleración de la frecuencia ventricular. Esta aceleración de la frecuencia ventricular reduce aún más la eficiencia cardíaca y aumenta el consumo de oxígeno (54).

Aunque hay varias enfermedades que predisponen a padecer FA, su fisiopatología y etiología no se conocen con exactitud (44) (54) (55). En la fisiopatología de la FA intervienen, como mínimo, tres procesos: 1) una serie de mecanismos electrofisiológicos que desencadenan la arritmia; 2) una remodelación electrofisiológica o alteración de la electrofisiología cardíaca que favorece la génesis, recurrencia o persistencia de la FA; 3) una remodelación estructural o alteración de la estructura auricular que favorece la génesis, recurrencia o persistencia de la FA. Las remodelaciones estructurales y electrofisiológicas que a veces preceden a la FA propician la aparición de la enfermedad. Una vez desencadenada la FA, podría producirse una nueva remodelación que contribuya a la persistencia y progresión de la arritmia (44) (54). Se han señalado dos mecanismos electrofisiológicos como principales causas subyacentes de la FA: 1) Focos ectópicos de activación; 2) Reentrada de múltiples ondas; los cuales son mecanismos no excluyentes que pueden coexistir en un paciente.

El cuadro clínico de la FA es sumamente variable. Algunos pacientes no muestran síntomas (FA asintomática). En estos casos el diagnóstico de la FA es fortuito, por ejemplo durante un electrocardiograma (ECG) rutinario o una hospitalización por infarto de miocardio o ictus (55) (54). Según las estimaciones, el porcentaje de casos asintomáticos oscila entre el 10% y el 40% (56) (57). En los pacientes con un episodio inicial sintomático, la FA puede volverse asintomática al cabo del tiempo si progresa a la forma permanente, un fenómeno especialmente frecuente en los ancianos (56) (57). Los síntomas habituales de la FA son ansiedad, palpitaciones, disnea, mareos, dolor torácico, debilidad episódica o progresiva y astenia (44) (55) (58) (59).

La FA se puede clasificar en función de diversos criterios, como los hallazgos electrocardiográficos, la cartografía de la actividad eléctrica auricular o el cuadro clínico (44). Un criterio especialmente útil es el que diferencia la FA primaria de la secundaria: la FA secundaria obedece a una causa aguda y posiblemente reversible, como el *hipertiroidismo* (55). Otro criterio distingue la FA valvular de la no valvular. La FA no valvular engloba los casos con ausencia de valvulopatía mitral reumática, prótesis valvular o reparación valvular (44). Sin embargo, a efectos de la toma de decisiones clínicas, la FA se clasifica principalmente en función de su duración. Las directrices vigentes de la ESC (*European Society of Cardiology*) sobre la FA, publicadas en 2010,

definen cinco tipos de FA que deben tenerse en cuenta en la práctica clínica (54). Estos tipos son:

- 1) **FA diagnosticada por primera vez:** Cuando la FA se detecta por primera vez en un paciente, invariablemente se cataloga como FA diagnosticada por primera vez. A partir de ese momento la FA se clasifica en una de las siguientes categorías.
- 2) **FA paroxística:** Es una FA autolimitada, que normalmente remite en el plazo de 48 h. Transcurridas 48 h, la probabilidad de normalización espontánea del ritmo cardíaco es baja, por lo que debe contemplarse el uso de anticoagulación.
- 3) **FA persistente:** La FA se considera persistente cuando un episodio dura más de siete días o cuando es necesario revertir la arritmia mediante *cardioversión*, ya sea farmacológica o eléctrica.
- 4) **FA persistente de larga duración:** Es la FA de evolución igual o superior a un año, momento en que se adopta una estrategia de control del ritmo.
- 5) **FA permanente:** La FA se considera permanente cuando tanto el paciente como el médico aceptan la enfermedad y no se plantean una intervención para controlar el ritmo. Si se adopta una estrategia de control del ritmo en un paciente con FA permanente, la arritmia se redefine como FA persistente de larga duración.

En buena parte de los casos, con el tiempo, la FA progresa hacia una forma más grave (54). La FA puede provocar un ictus isquémico derivado de un tromboembolismo, es decir, debido a la formación de coágulos de sangre (trombos) que se desplazan a través del torrente sanguíneo y provocan la oclusión (embolismo) de una arteria cerebral. En la formación de trombos intervienen tres factores principales, que forman la tríada de Virchow (60). Estos factores son:

- 1) **Estasis sanguínea:** La FA provoca insuficiencia sistólica auricular y pérdida de la contracción auricular organizada, que derivan en estasis sanguínea al quedar estancada en las aurículas la sangre que no se bombea a los ventrículos (61). La dilatación auricular progresiva asociada a la FA favorece la trombosis. La estasis sanguínea es especialmente frecuente en la aurícula izquierda, concretamente en la orejuela de la aurícula izquierda (OAI). La OAI constituye el principal foco

trombótico, tanto en los pacientes con FA como en los que presentan un ritmo sinusal normal (44). Determinados factores de riesgo de ictus, como el envejecimiento y la hipertensión, se asocian a una disminución de la contractilidad y la velocidad del flujo sanguíneo en la OAI (62). La estasis se forma debido a la agregación de los eritrocitos mediada por la interacción con el FNG (61) (63).

- 2) **Disfunción endotelial:** En los pacientes con FA se observan anomalías en el endotelio auricular, que adquiere un aspecto áspero y rugoso a consecuencia del edema y la fibrosis, además de presentar zonas sin endotelio. La disfunción endotelial es indicativa de una alteración en los niveles de una serie de compuestos que intervienen en la coagulación, como se expone a continuación (61).
- 3) **Hipercoagulabilidad:** La FA se asocia, asimismo, a un estado de hipercoagulabilidad. Se han observado anomalías en los niveles de diversos factores de la coagulación, tales como: fragmentos de protrombina 1 y 2, dímero D, β -tromboglobulina, FVW, FT, interleucina, y proteína C-reactiva (PCR) (61) (62).

En la FA existe una compleja interrelación entre los tres factores de la tríada de Virchow.

3.1.3. Estratificación del riesgo tromboembólico y hemorrágico en la FA

Existen dos índices de estratificación de riesgo tromboembólico para pacientes con FA: CHADS₂ y CHA₂DS₂-VASc Score, los cuales se utilizan fundamentalmente para decidir sobre la elección del tratamiento anticoagulante o antiagregante. Los ensayos clínicos han utilizado el índice CHADS₂ para estratificar los riesgos de los pacientes, que incluye factores de riesgo comunes de accidente cerebrovascular (ACV) como la insuficiencia cardiaca congestiva, hipertensión, edad ≥ 75 años, diabetes mellitus, e ictus previo o isquemia transitoria. El índice CHA₂DS₂-VASc es la evolución de su antecesor (índice CHADS₂), el cual responde a la crítica que se hizo a su precedente de que no incluía algunos factores que también podrían influir en la aparición de ACV, aunque es ligeramente más complejo; donde a las siglas de CHADS₂, se añaden la evaluación de

enfermedad cardiovascular previa, y el sexo, que son los parámetros en los que se basa el actual sistema de evaluación. Su resultado es una puntuación, que indica el porcentaje de riesgo de sufrir un ACV en los siguientes doce meses. Su utilización es recomendada por las Sociedades Europea y Canadiense de Cardiología. Las guías actuales recomiendan anticoagulación si el CHADS₂ es ≥ 2 . También proponen anticoagulación si el CHADS₂ es 1 y el paciente presenta escaso riesgo hemorrágico. En base a la escala CHA₂DS₂-VASc, los pacientes con una puntuación ≥ 2 deben recibir un anticoagulante oral (AO); los pacientes con 1 punto deben recibir tratamiento antitrombótico con un AO o 75–325 mg/día de AAS (preferiblemente AO); y los pacientes con puntuación 0 pueden ser tratados con AAS o no recibir tratamiento antitrombótico (esta opción es preferible) (64) (65).

Tanto el uso del CHADS₂, como el CHA₂DS₂-VASc se aconsejan en conjunción con otros sistemas de evaluación del riesgo de sangrado (HAS-BLED, HEMORR₂HAGES, ATRIA, y otros). La decisión de instaurar tratamiento anticoagulante debe basarse siempre en los riesgos absolutos de ACV y hemorragia, y en el riesgo/beneficio relativos para un paciente. La escala de riesgo HAS-BLED es una herramienta sencilla y práctica que permite evaluar el riesgo hemorrágico individual y puede ayudar a tomar decisiones clínicas sobre el tratamiento antitrombótico en pacientes con FA, que incluye factores de riesgo comunes de sangrado (hipertensión, función renal y hepática anormal, ictus previo, historia o predisposición al sangrado, INR lábil [si el paciente está tomando un AVK], edad >65 años, y fármacos concomitantes o abuso/exceso de la ingesta de alcohol). Una puntuación ≥ 3 indica un riesgo alto y requiere precaución con el uso de fármacos antitrombóticos; se recomienda la revisión periódica, el manejo de los factores corregibles de riesgo y la educación del paciente (66).

3.2. La patología aterosclerótica y el síndrome coronario agudo

3.2.1. Aterotrombosis

El endotelio de la pared vascular, consta de una monocapa de células que recubre todo el árbol vascular, separando la sangre de la pared vascular. Entre sus funciones se encuentra la regulación de la fluidez luminal de la sangre, permeabilidad vascular a lipoproteínas plasmáticas, expresión de proteínas adhesivas, reclutamiento

de monocitos, liberación de agentes con actividad pro- y antitrombótica, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas (como el óxido nítrico (NO) o la endotelina-1). En condiciones fisiológicas las células endoteliales exhiben propiedades antitrombóticas y fibrinolíticas que previenen la formación patológica de trombos (67) (68).

En la actualidad, se tiende a utilizar el término aterotrombosis, que por un lado hace referencia a la patología aterosclerótica y por otro sugiere presencia de complicaciones trombóticas, como un fenómeno que aparece durante la evolución de la enfermedad. Se ha sugerido que el desencadenante inicial de la enfermedad aterotrombótica es una disfunción endotelial. Es conocido que la disfunción endotelial promueve mecanismos de inflamación, oxidación de lipoproteínas, proliferación de células del músculo liso, deposición de matriz extracelular o lisis, acumulación de lípidos, activación plaquetaria y finalmente formación del trombo (69). Todos estos elementos favorecen la expresión de moléculas adhesivas en el endotelio, para atraer y adherir monocitos y linfocitos-T, que pueden estar unidos a plaquetas u otros leucocitos (70).

La exposición crónica y repetida a los factores de riesgo cardiovascular como infecciones, fenómenos inmunitarios, estrés hemodinámico, enzimas eicosanoides liberadas por las plaquetas y leucocitos en los estados de inflamación, hiperhomocisteinemias, entre otras (67) (71) (72) (73), producen una activación/disfunción del endotelio que se caracteriza por una disminución de NO y de todos los mecanismo fisiológicos de protección vascular (74). Esto facilita la acumulación y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la pared, que a su vez favorece la infiltración de monocitos por ser un gran estímulo inflamatorio (75). En el espacio endotelial estas células se diferencian a macrófagos, los cuales captan lípidos en gran cantidad y se transforman en células espumosas. Asimismo, factores de crecimiento, citosinas liberadas por las células endoteliales, monocitos/macrófagos, las plaquetas y los linfocitos T agravan la lesión endotelial y potencian la migración, proliferación y la síntesis de matriz extracelular por las células musculares lisas vasculares determinando el crecimiento de la placa aterosclerótica (76) (77). De este modo, se produce así, una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa.

Las placas de ateroma constan de células espumosas (monocitos convertidos en macrófagos que contienen lípidos fagocitados), células del musculo liso y lípidos

extracelulares recubiertos por una capa fibrosa rica en colágeno en contacto con la luz vascular. El componente escleroso, compuesto por el colágeno secretado por las células musculares lisas, estabiliza la placa y la protege de la rotura. El desarrollo de la placa es lento y la manifestación clínica habitual es la angina estable con una supervivencia elevada. Las placas más susceptibles a la rotura presentan un gran contenido lipídico (esteres y cristales de colesterol), mayor concentración de células espumosas y FT, baja densidad de células musculares lisas y una capa fibrosa muy delgada (78) (79), si se comparan con las placas estables, con el subsiguiente riesgo elevado de formación de un trombo. Los mecanismos que pueden producir la rotura de la placa son el espasmo coronario, actividad física extrema, trauma emocional severo, actividad sexual, exposición a drogas como cocaína o anfetaminas, infecciones, exposición al calor o simplemente actividades de la vida diaria (80) (81). La activación de macrófagos y linfocitos T localizados en la placa promueven la proliferación de células musculares lisas, las cuales pueden producir proteasas que digieren la matriz extracelular favoreciendo el proceso (82).

Cuando el desgarro de la placa es pequeño, la sangre penetra y expande la placa, pero no origina trombo en la luz arterial. Si la rotura o fisura de la placa es mayor, el material lipídico que la compone, muy rico en FT altamente trombogénico (83), queda expuesto al flujo sanguíneo y se produce la adhesión y a la agregación de las plaquetas, la generación de trombina y, finalmente la formación de un trombo de fibrina, que puede derivar en la aparición de un evento isquémico coronario (84).

En grado variable, las placas aterotrombóticas están compuestas de: un “*core*” o núcleo rico en lípidos (que contiene colesterol cristalizado, ésteres de colesterol y fosfolípidos), un “*shell*” o capa de tejido fibroso (con células vasculares de músculo liso y tejido conectivo de matriz extracelular que incluye colágeno, proteoglicanos y fibras elásticas de fibronectina), y finalmente células inflamatorias (como los macrófagos, y linfocitos-T) que producen varias enzimas y factores procoagulantes como el FT (85) (86). Las distintas placas ateroscleróticas pueden contener proporciones variables de los componentes previamente citados, y esto da lugar a todo un espectro de lesiones. La vulnerabilidad de una lesión coronaria viene determinada por la masa crítica del core lipídico, el grosor de la capa fibrosa y del alto contenido en macrófagos (87). Además, la disrupción de una placa de ateroma está influenciada tanto por fenómenos pasivos

como activos (69). Los fenómenos activos consisten en las fuerzas físicas que causan la disrupción. Esto normalmente sucede con más frecuencia en las zonas donde la capa fibrosa es más delgada, hay mayor infiltración de células espumosas (macrófagos más desarrollados ricos en FT y lípidos), y por lo tanto más débiles. Por otro lado, los fenómenos pasivos como la inflamación juegan también un papel clave en la disrupción de la placa. Esto sucede en zonas ricas en macrófagos los cuales son capaces de degradar la matriz extracelular debido a que tras un proceso de apoptosis secretan enzimas proteolíticas, como las metaloproteasas de la matriz (colagenasas, gelatinasas, etc.) (69). Durante este proceso apoptótico también se produce un *shedding* de micropartículas desde la membrana de las células y la expresión de fosfatidilserina que resulta en una actividad procoagulante incrementada. Todos estos datos sugieren que la composición de las placas atendiendo a sus proteínas principales, FT y colágeno, sea clave determinando su trombogenicidad.

La aterosclerosis por sí sola, raramente conduce a desenlaces fatales. Sin embargo, el evento agudo que puede comprometer la vida del paciente y que predominan en las lesiones que causan el SCA es la formación de un trombo sobre la ruptura o erosión de una placa de ateroma que produce una reducción aguda del flujo coronario, con o sin vasoconstricción concomitante, comprometiendo la oxigenación miocárdica (88) (89) (75) (90). De forma minoritaria, también pueden producirse por traumatismo, disecciones endoteliales, tromboembolias, vasculitis con implicación de las coronarias, anomalías congénitas, adicción a la cocaína y complicaciones del cateterismo cardiaco.

3.2.2. Epidemiología del síndrome coronario agudo

La enfermedad arterial coronaria (EAC) se ha convertido en una de las prioridades más importantes de la política sanitaria tanto por sus repercusiones sociales, económicas, como de impacto en los recursos sanitarios en muchos países. En España, la EAC lleva siendo la principal causa individual de muerte en la población de más de 30 años y el SCA es una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario en España (91) (92).

En los últimos años, se ha observado una reducción en la mortalidad a corto y largo plazo asociada al SCA, aumentando la supervivencia y pronóstico de estos

pacientes y, consecuentemente, aumentando la prevalencia de la enfermedad. La disminución de la mortalidad se asocia fundamentalmente a los avances en el diagnóstico, en tratamientos de reperfusión, mayor accesibilidad a la angioplastia primaria, aparición de la terapia antitrombótica moderna y estrategias de prevención secundaria (93) (94).

Los últimos datos epidemiológicos publicados en España señalan que la incidencia anual del SCA sin elevación del segmento ST (SCASEST) es más alta que el SCA con elevación del segmento ST (SCACEST). Un estudio reciente sobre la distribución del SCA en nuestro país estimó: 38.2% de SCACEST, 55.8% de SCASEST y un 6% de SCA no clasificable (91). También se estimó en el mismo estudio un importante aumento esperable en la incidencia de SCA durante los próximos 35-40 años, paralelo al envejecimiento poblacional. Así, desde 2013 a 2049 se espera que los casos de SCA se incrementen entre un 69 y un 116% en el grupo de edad más avanzada, aunque también se espera mayor incidencia en grupos de menor edad (91).

En el registro DIOCLES (Descripción de la Cardiopatía Isquémica en Territorio Español), la mortalidad intrahospitalaria de los pacientes con SCA en España (4.1%) disminuyó con respecto al último registro disponible (5.7%) correspondiente a los años 2004-2005 (95). El SCASEST presentó el menor índice de mortalidad hospitalaria (2.4%) frente a SCACEST (6.6%) y el SCA inclasificable (7.8%) (96). La mortalidad a los 30 días fue del 4.8%; 8% en SCACEST, 3.2% en SCASEST y 8.1% en SCA inclasificable. La mortalidad a los 6 meses de todos los pacientes fue del 3.8%. La supervivencia a los 6 meses fue mayor para SCASEST que para SCACEST y SCA inclasificable (96).

La FA en su forma permanente o paroxística es frecuente en los pacientes con SCASEST. El desarrollo de esta arritmia ocurre en 2-21% de pacientes con SCASEST. La FA aumenta el riesgo de empeoramiento de la isquemia, el desarrollo de insuficiencia cardíaca y de complicaciones tromboembólicas. La FA que complica el SCA se asocia con un aumento de la mortalidad en el hospital a largo plazo (97).

3.2.3. Fisiopatología del síndrome coronario agudo

El SCA se define como la presentación aguda de la cardiopatía isquémica (98) y comprende un conjunto de entidades clínicas cuyas manifestaciones incluyen la angina

inestable, el infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IMCEST), infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST) y la muerte súbita.

El síntoma principal que pone en marcha el proceso diagnóstico y terapéutico de los pacientes con sospecha de SCA es el dolor torácico. Basándose en el ECG, presencia o ausencia de elevación del ST, se puede encontrar dos categorías de pacientes (97):

1. Pacientes con dolor torácico agudo típico y elevación persistente (>20 min de duración) del segmento ST. Esta entidad se denomina SCACEST y generalmente refleja una oclusión coronaria aguda total. En la mayoría de estos pacientes se desarrollará en último término un IMCEST. El objetivo terapéutico se basa en una reperfusión rápida, completa y sostenida de la arteria coronaria responsable mediante angioplastia primaria o tratamiento fibrinolítico.
2. Pacientes con dolor torácico agudo pero sin elevación persistente del segmento ST. Esta entidad se denomina SCASEST y habitualmente pueden incluir una elevación transitoria del segmento ST, una depresión persistente o transitoria del segmento ST, una inversión de las ondas T, ondas T planas, o una pseudo-normalización de las ondas T o ausencia de cambios en el ECG cuando se presentan los síntomas.

El mecanismo fisiopatológico que con más frecuencia subyace en el SCA es la obstrucción parcial o total de una arteria coronaria por un trombo provocado por la rotura o erosión de una placa de ateroma preexistente en la luz arterial, produciendo complicaciones clínicas secundarias a la isquemia o necrosis miocárdica (88) (99). El tipo y grado de oclusión (total o parcial) y la duración de la isquemia producida por la trombosis aguda coronaria determinan la extensión del tejido necrosado o isquémico y la severidad del evento agudo.

La inflamación se cree que juega un papel clave en rotura de la placa, a pesar de los estímulos que inician el proceso inflamatorio agudo permanecen imprecisos (100) (101). La activación y agregación plaquetaria sobre la superficie trombogénica expuesta de una placa rota es un evento importante precoz en la patogénesis de la SCA (101) (102). Las plaquetas activadas liberan sustancias inflamatorias y mitogénicas en el microambiente, alterando principalmente la quimiotaxis, propiedades adhesivas y proteolíticas del endotelio (102). El endotelio vascular sano libera NO y prostaciclina, los

cuales inhiben la activación y agregación de plaquetas. Es probable que estos mecanismos contra-reguladores de tromborresistencia endotelial limiten el alcance y la duración de la activación plaquetaria en respuesta a la lesión vascular (102). Esta hipótesis explicaría por qué sólo una pequeña fracción de las placas rotas puede provocar síntomas mientras que la mayoría sanan en silencio. La naturaleza episódica de la activación plaquetaria, con el apoyo de los aumentos transitorios de la biosíntesis de TXA₂, es coherente con el concepto de la aterotrombosis coronaria como un proceso dinámico, en el que los episodios repetidos de formación de trombos y la fragmentación se producen a través de una placa rota (102). Por último, un espasmo focal o difuso de las arterias coronarias normales o ateroscleróticas, predominantemente causados por estímulos vasoconstrictores que actúan sobre las células del músculo liso vascular hiperreactivas, puede causar SCA.

El trombo es rico en fibrina y completamente oclusivo y sin circulación colateral en casos de IMCEST. La isquemia es más prolongada, con mayor duración del dolor y mayor extensión de la necrosis. Sin embargo, el trombo es rico en plaquetas, lábil y parcial o transitoriamente oclusivo con circulación colateral o no en los SCASEST. En la angina inestable la oclusión temporal no suele durar más de 20 minutos y no produce necrosis miocárdica. En el IMSEST, la interrupción del flujo dura más tiempo, aunque el territorio distal puede estar protegido por circulación colateral procedente de otros vasos, lo que limita la duración de la isquemia y la cantidad de miocardio necrosado. En este último caso, puede ocurrir que en lugar de la rotura se produzca la fragmentación de la placa en partículas pequeñas, que a su vez, pueden embolizar y ser arrastradas hasta ocluir capilares y arterias. Estos émbolos plaquetarios pueden causar zonas de necrosis en el miocardio irrigado por el vaso de origen, con la consecuente liberación de marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica. Además de la ruptura de la placa, otro fenómeno que puede desencadenar un SCA es la erosión de la placa. La formación de un trombo en estos casos podría verse facilitada por un estado de trombogenicidad sistémica aumentada. Este mecanismo es más frecuente en pacientes jóvenes, fumadores y mujeres (103) (104).

4. ANTICOAGULANTES DE ACCIÓN DIRECTA Y APIXABAN

Los tratamientos anticoagulantes convencionales pueden reducir significativamente el riesgo de trombosis en el territorio venoso, y el ictus o embolismo sistémico en pacientes con FA. Los anticoagulantes orales clásicos basado en el antagonismo de la vitamina K han demostrado eficacia en la prevención de complicaciones tromboembólicas en este contexto clínico. Desafortunadamente, los AVK tienen limitaciones inherentes, incluyendo, retraso en el inicio de su acción, estrecho rango terapéutico, la variabilidad de su respuesta, la necesidad de control continuado y numerosas interacciones con otros medicamentos y alimentos. Dado que la frecuencia de ictus relacionado con la FA aumenta con la edad, las guías de las diferentes sociedades científicas advierten de que el riesgo de sangrado en un paciente debe cuantificarse antes de la exposición a la anticoagulación y sopesar frente el riesgo de ictus con y sin anticoagulación. A pesar de los esfuerzos para una correcta evaluación clínica de la relación riesgo/beneficio, no todos los pacientes con FA con riesgo tromboembólico reciben el tratamiento anticoagulante adecuado (10). Consecuentemente, se consideró que se necesitaban nuevas estrategias para optimizar la prevención del ictus isquémico embólico, a menudo mortal o incapacitante, causada por FA. En la última década, el desarrollo de los nuevos anticoagulantes orales (NACOs), actualmente también conocidos como anticoagulantes orales de acción directa (ACODs), con mecanismos de acción más específicos, amplio rango terapéutico y con menos interacciones farmacológicas, podría ser una nueva opción terapéutica para estos pacientes. Aun así, en algún caso estos nuevos fármacos podrían producir hemorragia y, por consiguiente, sería necesario la determinación y control de su actividad anticoagulante, además de la investigación sobre la reversión de dicho efecto en caso necesario (11). Los ACODs se clasifican en dos grupos dependiendo de su mecanismo de acción, dirigidos a la inhibición directa del FIIa (trombina), como ximelagatran y dabigatran etexilato (Pradaxa®); o del FXa, como rivaroxaban (Xarelto®), apixaban (Eliquis®), y edoxaban (Lixiana®) (12).

Apixaban es un ACOD con una acción inhibitoria directa, específica y reversible del FXa. Estudios clínicos previos, realizados con miles de pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor, han demostrado un alto perfil de seguridad y eficacia en la profilaxis

y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. Los resultados de dos grandes ensayos clínicos en fase 3 (ARISTOTLE y AVERROES) (13) (14) han demostrado la eficacia y seguridad de apixaban (5 mg BID; y con reducción de dosis a 2,5 mg BID para pacientes con FA no valvular (FANV) y al menos 2 de las siguientes características: edad ≥ 80 años, peso corporal ≤ 60 kg, o creatinina sérica $\geq 1,5$ mg/dL (133 $\mu\text{mol/L}$) en comparación con AAS o warfarina en la prevención del ictus en pacientes con FA. Para los pacientes no aptos para el tratamiento con AVK, apixaban mostró más eficacia que la AAS en la prevención del ictus con similares niveles de seguridad con respecto a los riesgos de sangrado. La eficacia y seguridad de apixaban en los últimos ensayos clínicos fue consistente a través de varios análisis de subgrupos (13) (14).

En el caso de los pacientes que han presentado un SCA, a pesar de ser tratados con doble antiagregación (inhibidores del receptor plaquetario [P2Y₁₂; clopidogrel, ticopidina, ticagrelor, prasugrel y cangrelor] + AAS), permanecen en riesgo de presentar nuevos eventos tromboembólicos. Debido a que sobre las lesiones ateroscleróticas causantes de la clínica existe una trombosis que es la causa directa del episodio clínico, siempre ha habido interés en investigar los posibles beneficios de los anticoagulantes añadidos al tratamiento antiagregante habitual. Cuando se trata de pacientes con SCA, en los que se realiza intervencionismo coronario suele ser necesaria la implantación de un stent coronario, lo que conlleva tratamiento indefinido con anticoagulante, por la FA, y con doble antiagregación, por el stent, por un tiempo variable, que va, según el tipo de stent y el paciente, de uno a 12 meses. Esto conlleva, lógicamente, un incremento del riesgo de sangrado. En este contexto, no es bien conocido qué papel pueden jugar los ACODs como los inhibidores del FXa y los inhibidores directos de la trombina.

Con el objetivo de evaluar la eficacia y seguridad de los anticoagulantes de nueva generación en comparación con placebo en pacientes con un SCA que reciben doble terapia antiplaquetaria Komócsi et al. (105) diseñaron un metaanálisis en el que se incluyeron todos los estudios que habían evaluado los ACODs, tanto anti-Xa como inhibidores directos de la trombina en pacientes con un SCA y terapia antiagregante dual. Los indicadores de eficacia fueron la trombosis del stent, mortalidad global y un evento combinado de eventos isquémicos mayores. Los indicadores de seguridad fueron los eventos mayores de sangrado según los criterios del grupo TIMI. El beneficio clínico neto se calculó como la suma del evento isquémico combinado y los sangrados

mayores. Se evaluaron un total de 7 ensayos clínicos que englobaron a más de 30.000 pacientes con un SCA, doble antiagregación y un ACOD (ximelagatran, darexaban, dabigatran, apixaban, edoxaban y rivaroxaban). Globalmente, el uso de estos nuevos anticoagulantes orales se asoció a un incremento significativo de eventos de sangrado (OR 3,03; IC 95%: 2,20-4,26, $p < 0,001$). También se objetivó un descenso significativo (aunque moderado) del riesgo de trombosis del stent y del evento isquémico combinado, sin diferencias en la mortalidad global. Lo más interesante de los resultados es en lo concerniente al beneficio clínico neto, sin encontrarse ventajas con la asociación de los anticoagulantes (OR 0,98; IC 95%: 0,90-1,06, $p=0,57$). Los autores concluyen que el uso de los ACODs añadidos a la doble terapia antiplaquetaria no aporta un claro beneficio clínico en pacientes que han sufrido un SCA (105). Habrá que ver si existe un contexto clínico de interés en el que este tipo de tratamiento (triple terapia) tiene su lugar, pues en muchos de ellos la dosis utilizada es diferente a la recomendada para, por ejemplo, prevención del ictus en FA, arritmia que frecuentemente suelen tener este tipo de pacientes.

La utilización de anticoagulantes en el SCA durante la fase aguda y a largo plazo ha mejorado su pronóstico debido a la reducción de episodios trombóticos, pero asociándose a mayor riesgo de sangrado. En los últimos años se han desarrollado los ACODs, los cuales no requieren monitorización y presentan menor riesgo de sangrado. Por el momento, rivaroxaban es el único ACOD que ha presentado un perfil de riesgo-beneficio favorable en pacientes con SCA. El estudio ATLAS ACS 2-TIMI 51 es el primer ensayo de fase III que demuestra que la adición de rivaroxaban a “dosis muy baja” (2,5 mg BID; frente a dosis plenas de 20 mg QD [desde el día 22 en adelante. Del día 1 a 21: 15 mg BID] para la indicación de la prevención del ictus y embolia sistémica con FANV) a la terapia antiagregante óptima reduce la mortalidad, la mortalidad cardiovascular, el infarto o el ictus sin un aumento significativo en los sangrados fatales. Este estudio fue un ensayo clínico controlado con placebo en el que se distribuyó aleatoriamente a 15.526 pacientes en tres grupos (106), uno tratado con 2,5 mg BID (“dosis muy baja”), otro con 5 mg BID (“dosis baja”) y otro con placebo. Todos los pacientes estaban recibiendo tratamiento médico estándar, incluyendo AAS a dosis bajas y una tienopiridina (clopidogrel o ticlopidina de acuerdo con las directrices nacionales o locales). El objetivo de eficacia era la suma de infarto de miocardio, ictus y muerte de

origen cardiovascular. Se observó que rivaroxaban, comparado con placebo, reducía de manera significativa el objetivo de eficacia el 8,9% y el 10,7%, con las dosis de 2,5 mg BID y 5 mg BID, respectivamente. Además, la “*dosis muy baja*” de 2,5mg BID redujo la mortalidad cardiovascular (el 2,7 contra el 4,1%; $p=0,002$) y la mortalidad por cualquier causa (el 2,9 contra el 4,5%; $p=0,002$). Esto no se observó con la “*dosis baja*” de 5mg BID. Rivaroxaban a dosis-combinada (2,5 mg BID y 5 mg BID) aumentó el sangrado mayor (el 2,1 frente al 0,6%; $p<0,001$) y la hemorragia intracraneal (el 0,6 frente al 0,2%; $p=0,009$) sin incremento de sangrado mortal. La “*dosis muy baja*” de rivaroxaban produjo menos hemorragias mortales que la “*dosis baja*” (el 0,1 frente al 0,4%; $p=0,04$). El estudio demostró que añadir anticoagulación oral a “*dosis muy baja*” (2,5mg BID) a los antiagregantes puede ser útil en la prevención de recurrencias tras un SCA (106). Gracias a esta evidencia la EMA aprobó, el pasado mes de Mayo 2013, la indicación de Xarelto® (rivaroxaban) 2,5 mg BID para la prevención de eventos aterotrombóticos en pacientes adultos tras un SCA con biomarcadores cardiacos elevados se administra en combinación con AAS sólo, o con AAS más clopidogrel o ticlopidina.

Asimismo, en el estudio APPRAISE-2 se comparó apixaban en dosis de 5mg BID con placebo en pacientes antiagregados después de un SCA (107). El ensayo tuvo que suspenderse prematuramente, tras incluir a 7.392 pacientes, debido a un incremento de sangrados sin una reducción de eventos coronarios recurrentes. El objetivo de eficacia (muerte cardiovascular, infarto e ictus) ocurrió en el 7,5% de los pacientes del grupo de apixaban (13,2% pacientes/año) y en el 7,9% del grupo placebo (14% pacientes/año). Ocurrieron hemorragias mayores en el 1,3% del grupo de apixaban (2,4 eventos/100 pacientes/año) y en el 0,5% del grupo placebo (0,9 eventos/100 pacientes/año) (con apixaban, *hazard ratio* [HR]=2,59; intervalo de confianza del 95% [IC95%], 1,50-4,46; $p=0,001$). También se observaron más sangrados intracraneales en el grupo de apixaban.

Apixaban y rivaroxaban pertenecen al mismo grupo farmacológico, inhibidores del FXa, sin embargo no han proporcionado resultados similares en pacientes con SCA que precisan triple terapia antitrombótica. Probablemente estas diferencias pueden estar relacionadas con el diseño y dosificación de los fármacos. El estudio APPRAISE-2 incluye un 10% de pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular, sin embargo, en el estudio ATLAS ACS 2-TIMI 51 se excluyeron los pacientes con infarto

cerebral isquémico. También la dosis de rivaroxaban utilizada es más baja que en los ensayos de prevención del ictus isquémico en FA. Consecuentemente, las dosis bajas de anticoagulación pueden ser más adecuadas para los pacientes que precisen triple terapia en el caso de los fármacos anti-Xa, no siendo igual para el caso de dabigatran (anti-trombina), donde en el estudio RE-DEEM (108), las dosis bajas de dabigatran no demostraron mejor eficacia (dabigatran, asociado a doble terapia antiplaquetaria, fue asociado a un incremento de sangrados dosis-dependiente en pacientes con un infarto de miocardio reciente), aunque el diseño del estudio no pretendió llegar a esa conclusión. Estos hallazgos apoyan el concepto de que una baja intensidad de inhibición del FXa puede ser más efectiva en la prevención secundaria de SCA (109).

HIPÓTESIS

Los ACODs han sido propuestos como una alternativa a los anticoagulantes clásicos, incluyendo entre estos los AVKs y las heparinas. Los ACODs poseen mecanismos de acción más específicos, facilidad de manejo, rapidez de acción, amplio rango terapéutico, menos interacciones farmacológicas, y no precisan sistemáticamente monitorización ni ajuste de dosis para asegurar su eficacia y su seguridad. No obstante, el grado de anticoagulación puede variar en función de su dosificación e intervalo entre dosis.

Teniendo en cuenta los buenos resultados de los ACODs frente a warfarina en la prevención de ictus debida a la FA, y frente a enoxaparina en el tromboembolismo venoso, sería procedente investigar la posible sinergia de un tratamiento combinado antiplaquetario con ACODs en el marco del SCA. Actualmente, de todos los ACODs aprobados por las Agencias Reguladoras, sólo rivaroxaban ha mostrado unos resultados satisfactorios en esta indicación, reduciendo el riesgo del criterio de valoración combinado de muerte por causas cardiovasculares, infarto de miocardio o ictus (106); en cambio, los mostrados con apixaban en el estudio APPRAISE-2 no fueron positivos (107). Una de las hipótesis de que apixaban no pudiera demostrar eficacia, sin sacrificar la seguridad, incrementado los sangrados, sería que la dosis seleccionada en este último estudio fue demasiado alta, y se debería haber reducido frente a la utilizada en FA (5 mg BID), pero esta posibilidad aún no se ha investigado en detalle (15). Asimismo, la actividad inhibidora de apixaban sobre la generación de trombina debe ser considerada como una ventaja importante; sin embargo, su efecto sobre la actividad procoagulante mediada por plaquetas y su acción antiplaquetaria no han sido evaluadas convenientemente.

La activación plaquetaria, la generación de trombina local y la formación de fibrina son tres elementos clave para el mantenimiento de la hemostasia que también contribuyen a la formación de trombos oclusivos en los territorios arteriales. Los mecanismos de acción de apixaban apoyan su potencial uso terapéutico en la prevención de complicaciones trombóticas en el sistema vascular arterial, sin embargo los efectos de este agente sobre la activación y agregación plaquetaria no se han investigado en detalle. Persisten algunos mecanismos de acción de apixaban por dilucidar, sobre todo los que refieren a la generación de trombina en un modelo celular

de la coagulación en presencia de un número elevado de plaquetas, una situación patológica que precede al desarrollo de eventos trombóticos en el territorio arterial.

Esta tesis ha tratado de actualizar la información disponible sobre la farmacología y los datos clínicos de apixaban en la prevención del ictus y de la embolia sistémica en pacientes con FA, y la posterior evaluación y cuantificación de los efectos inhibidores de apixaban sobre diferentes aspectos de la formación de trombos en el territorio arterial. Para la confirmación de las hipótesis planteadas se han utilizado distintas aproximaciones experimentales en condiciones de flujo dinámico y estático con el fin de determinar si apixaban a dosis más bajas, que a las que están indicadas para la prevención y tratamiento de complicaciones tromboembólicas, podría ser un candidato para la prevención de eventos isquémicos en el territorio arterial.

OBJETIVOS

El objetivo final de esta tesis doctoral ha sido investigar distintos aspectos de la acción antiplaquetaria de apixaban. Para conseguirlo nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Actualizar la información disponible sobre apixaban en la prevención del ictus y de la embolia sistémica en pacientes con FANV, en todas su subpoblaciones, mediante la publicación de un manuscrito indexado.
2. Estudiar y cuantificar los efectos asociados a apixaban sobre diferentes aspectos de la formación del trombo, mediante aproximaciones experimentales con distintas condiciones de flujo que evaluaran:
 - a. La deposición de fibrina y la agregación plaquetaria sobre una superficie trombogénica, en un modelo experimental de trombosis con sangre circulante a índices de cizalladura arteriales.
 - b. Las propiedades tromboelastométricas del coágulo en formación mediante el sistema ROTEM.
 - c. La generación de trombina local aplicando un modelo celular de la coagulación en un medio enriquecido en plaquetas.
3. Evaluar la posibilidad de que apixaban a dosis más bajas, que a las que están indicadas para la prevención y tratamiento de complicaciones tromboembólicas, ofreciese una relación favorable riesgo-beneficio en la prevención o tratamiento de las complicaciones isquémicas/trombóticas en el territorio arterial.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones referidas en esta tesis se ajustaron a la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos; y con los principios resumidos en la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Investigación Clínica (Registro: 2011/6837). El protocolo para aislar aortas de conejos, utilizadas como substrato trombogénico, también fue aprobado por el Comité Ético de Animales de la Universidad de Barcelona (CEEA Registry: 473/12).

La presente tesis está constituida por dos partes bien diferenciadas con diferente metodología: una parte bibliográfica, y una parte experimental de laboratorio.

Diseño de la revisión bibliográfica de apixaban en la prevención de ictus y la embolia sistémica en fibrilación auricular no valvular

En la primera etapa de esta tesis doctoral se realizó una revisión exhaustiva de toda la bibliografía, una consulta de las bases de datos, fuentes de la web de *ClinicalTrials.gov*, fondos de la Universidad de Barcelona, sobre apixaban en la prevención del ictus y de la embolia sistémica con FA no valvular (FANV), ya que en ese momento no existía ninguna revisión que recopilase e incluyese todos los datos farmacológicos, y todos los subgrupos de pacientes de los estudios pivotaes. En primer lugar, se hizo una revisión de la farmacología pre-clínica, farmacocinética y metabolismo de Apixaban. A continuación, se analizaron todos los estudios clínicos, tanto en la trombopprofilaxis venosa como la prevención del ictus y de la embolia sistémica con FANV. La revisión bibliográfica sobre Apixaban se publicó como "*Apixaban in the Prevention of Stroke and Systemic Embolism in Nonvalvular Atrial Fibrillation*", el pasado mes Julio de 2013. Esta revisión no incluye datos de estudios con apixaban en el contexto del SCA.

Diseño experimental

El objetivo del estudio experimental fue evaluar los efectos de apixaban en dosis terapéuticas y sub-terapéuticas en diferentes modelos de hemostasia: 1) Las modificaciones en las propiedades adhesiva-cohesivas de las plaquetas y en la

formación de fibrina se evaluaron con dispositivos de perfusión, mediante sangre total circulante a través de segmentos vasculares dañados, y un índice de cizalladura similar a los encontrados en las arterias de tamaño medio; 2) Los cambios en los parámetros tromboelastométricos durante la formación de coágulos de sangre citrada se investigaron mediante el sistema *ROTEM Thromboelastometry Analyser*; y 3) La contribución de las plaquetas a la dinámica de generación de trombina local, se estudió utilizando un modelo celular *in-house* de generación de trombina mediado por plaquetas, en un ensayo fluorimétrico con un sustrato fluorogénico (Technoclone GmbH, Austria).

Reactivos

El Tampón Fosfato Salino (PBS) fue de Gibco BRL Life Technologies (Paisley, UK). El kit de incrustación JB-4 para procesamiento histológico fue de Polyscience (Warrington, EE.UU.). Los reactivos de tromboelastometría ROTEM, ex TEM® y star-TEM®, fueron de Pentapharm GmbH (Múnich, Alemania). La generación de trombina se evaluó con el sustrato fluorogénico de Technoclone GmbH (Viena, Austria). El FT expuesto en vesículas de fosfolípidos para activar la generación de trombina fue Thromborel® S (*placental human Tissue Factor*; pTF), de Siemens Healthcare (Marburg BmbH, Alemania).

Apixaban

El principio activo apixaban fue proporcionado por Bristol-Myers Squibb (NY, EE.UU.). Apixaban se disolvió inicialmente en etanol, y posteriormente se diluyó en solución salina a una concentración madre final de 1 µg/mL. Las muestras de sangre fueron incubadas con diferentes concentraciones de apixaban (0, 10, 40 y 160 ng/mL) durante 30 min a 37°C. La concentración de 160 ng/mL de apixaban es equivalente a la concentración máxima (C_{max}) en el estadio estacionario después de la administración de 5 mg BID, correspondiente a la dosis recomendada para la prevención de ictus y embolia sistémica en pacientes con FA (110). La concentración de 40 ng/mL es compatible con la concentración mínima (C_{min}) después del mismo régimen posológico

de apixaban, y la concentración de 10 ng/mL podría ser compatible con la C_{min} alcanzada después de una administración de 2,5 mg BID de apixaban (111).

Recogida de sangre y aislamiento de plaquetas

Las muestras de sangre fueron extraídas de donantes sanos que en los 10 días previos no habían tomado ningún fármaco conocido que afectara a las plaquetas o el sistema de coagulación. La sangre se recogió en tubos de citrato de BD Vacutainer™ llevando a una concentración de citrato final de 11 mM. Para los estudios de la generación de trombina, la sangre total fue separada en plasma y plaquetas aisladas. El plasma citrado se obtuvo por centrifugación de tubos a 1.100xg durante 5 min. Las plaquetas se separaron como plasma rico en plaquetas (PRP; 120xg, 7 min) y se lavaron 3 veces con un tampón que contiene citrato de sodio 93 mM, ácido cítrico 7 mM, dextrosa 140 mM, adenosina 5 mM y teofilina 3 mM (pH 6,5). El sedimento (*pellet*) final se resuspendió a 1×10^6 plaquetas/L en solución salina equilibrada de Hank (136,8 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 0,6 mM Na_2HPO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 , 0,2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) suplementado con dextrosa 2,7 mM y NaHCO_3 4,1 mM (pH 7.2). Las suspensiones de plaquetas se dejaron en reposo a 37 °C durante 30 min (112).

Estudios de perfusión

Alícuotas de sangre incubadas previamente con apixaban fueron recalcificadas con una solución de CaCl_2 , e inmediatamente perfundidas a través de cámaras anulares quedando expuestas a un segmento vascular dañado de aorta de conejo, como sustrato trombogénico (113). Las aortas fueron extraídas de conejas New Zealand jóvenes (2.8-3.0 Kg; <http://www.granjasanbernardo.com/>). Las conejas fueron sedadas con una combinación de quetamina intramuscular (30 mg/Kg) + xilacina (5 mg/Kg), y *a posteriori* se les realizó una eutanasia usando una sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico intravenoso; 500 mg/Kg). La muerte fue confirmada por desangrado total. Para evitar la formación de coágulos que se pudiesen adherirse al endotelio, se realizó una apertura por el tórax permitiendo canular la vena cava en la zona de unión entre las venas iliaca y renal, y lavar el circuito vascular con solución salina. La aorta fue extirpada mediante un corte en el punto donde las dos venas ilíacas se separan. Los vasos extraídos fueron

limpiados de restos de capilares y grasa, y seguidamente evertidos, quedando la pared interna del vaso expuesta hacia el exterior. A continuación, los vasos se cortaron en seis segmentos de 1 cm de longitud y el endotelio fue eliminado químicamente con 20 U/mL de α -quimiotripsina (37^o, *overnight*), dejando expuestas las proteínas subendoteliales. Estos segmentos vasculares dañados fueron almacenados en PBS a -20^oC hasta su uso. Cada experimento fue llevado a cabo con vasos de la misma coneja, para evitar variaciones inter-individuales. Se realizaron estudios de perfusión a un índice de cizalladura de 800 s⁻¹, durante 5 min. Los vasos perfundidos se limpiaron con PBS, fijaron con glutaraldehído al 2,5% (4^oC, 24 h) y se procesaron histológicamente para su evaluación morfométrica. La deposición de fibrina y las interacciones plaquetarias fueron evaluadas por microscopía óptica en cortes histológicos transversales semifinos de los vasos perfundidos.

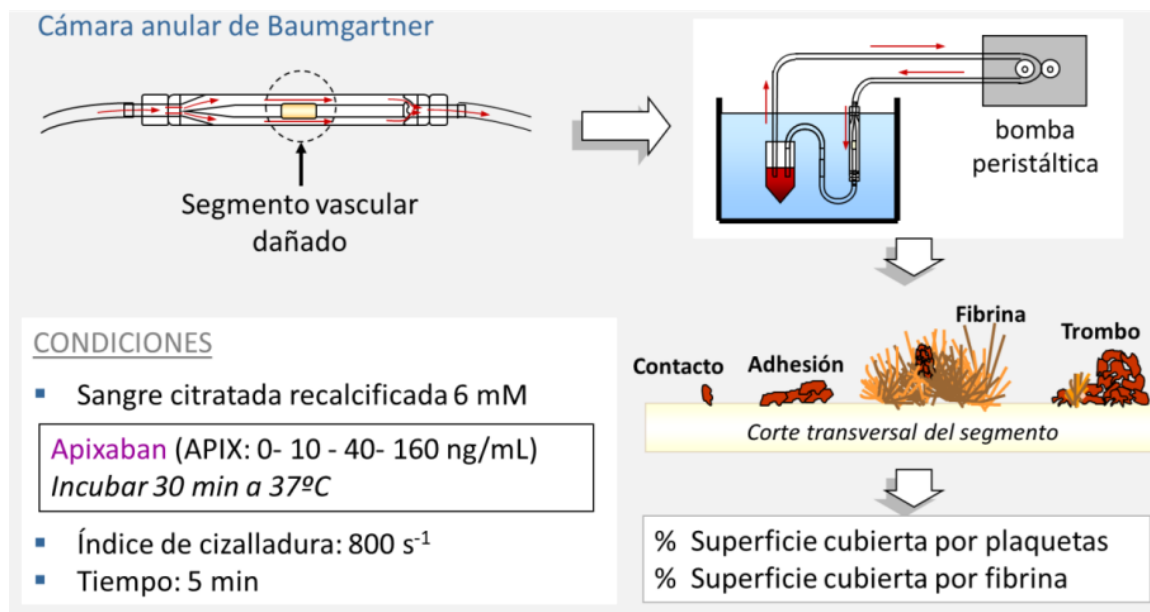


Figura 7. Esquema del experimento de perfusión para el estudio de la deposición de fibrina y la agregación plaquetaria

Un software específicamente desarrollado clasificó y cuantificó automáticamente la cobertura de plaquetas y fibrina presente en 20 campos microscópicos elegidos aleatoriamente en secciones no adyacentes (114). Las interacciones plaquetarias con las superficies vasculares expuestas se evaluaron como porcentaje de la superficie total del vaso cubierto por plaquetas. La presencia de masas

plaquetarias más grandes (agregados de >5 μm de altura) también se expresaron como un porcentaje de la superficie total del vaso. Del mismo modo, la presencia de fibrina en los mismos campos microscópicos se cuantificó también morfométricamente y se expresó como un porcentaje de cobertura de fibrina depositado en el subendotelio.

Estudios de tromboelastometría

Las modificaciones en los parámetros tromboelastométricos durante la formación de coágulos en muestras de sangre citradas e incubadas previamente con apixaban (0, 10, 40 y 160 ng/mL) fueron investigadas mediante *ROTEM Thromboelastometry Analyser* (Pentapharm GmbH, Múnich, Alemania) (113).

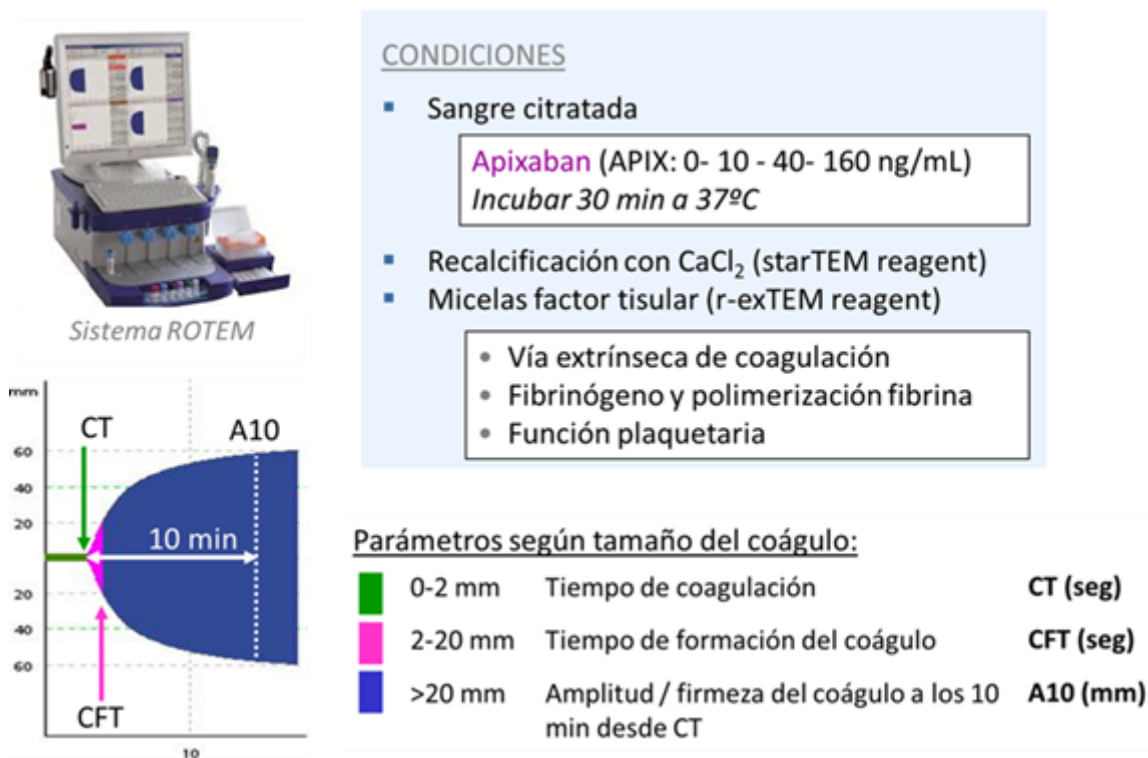


Figura 8. Esquema de las propiedades tromboelastométricas del coágulo en formación mediante ROTEM.

La formación del coágulo fue activada por la adición de reactivo ex-TEM[®] y recalcificación con star-TEM[®], ambos disponibles comercialmente. La prueba ex-TEM[®] mide los cambios en la vía extrínseca de la coagulación, la polimerización del FNG y la fibrina, y la función plaquetaria. Los coágulos obtenidos con ex-TEM[®] se componen de

plaquetas y fibrina. El *tiempo de coagulación* (TC) y el *tiempo de formación del coágulo* (TFC) indican la cinética de la formación de coágulos y se expresan en segundos. La amplitud de coágulo proporciona información acerca de la fuerza y la estabilidad de los coágulos, que depende en gran medida sobre el FNG y las plaquetas, y se expresa en milímetros. El TC se define como el tiempo que el coágulo formado alcanza 2 mm; el TFC es el tiempo en que este coágulo llega a 20 mm; y la amplitud de coágulo después de 10 min (A10) es una medida de la firmeza del coágulo en este punto del tiempo.

Modelo mediado por plaquetas de la generación de trombina

La contribución de las plaquetas a la generación local de trombina se investigó en un modelo celular diseñado y optimizado, utilizando un ensayo fluorométrico modificado (Technoclone GmbH, Austria). Suspensiones de plaquetas lavadas a 1×10^6 plaquetas/ μL en una solución salina equilibrada de Hanks, fueron usadas como fuente de fosfolípidos aniónicos y factores liberados de los gránulos después de la activación en aras de potenciar la generación de trombina. La adición de plasma citrado al 7.5% (plasma pobre en plaquetas; PPP) aseguró la presencia suficiente de factores de coagulación para iniciar y mantener la generación de trombina sin ser el principal contribuyente a la misma. Esta mezcla fue incubada con diferentes concentraciones de apixaban (0, 10, 40 y 160 ng/mL) durante 30 min a 37°C. La generación de trombina se inició por adición de FT 1,1 pM expuesto a micelas de fosfolípidos y un sustrato fluorogénico que también contiene CaCl_2 para favorecer la activación de los mecanismos de coagulación (115). La fluorescencia generada se evaluó a una longitud de onda de 390/450 nm (excitación/emisión) durante 90 min (a intervalos de 1 min) y las unidades de fluorescencia fueron analizadas con *Thermo Fluoroskan Ascenso Software* (Technoclone GmbH). Los parámetros evaluados en nuestros estudios fueron: la fase de latencia (min), el pico de trombina máximo (nM) y el tiempo para alcanzar este pico (min). Estudios paralelos se realizaron con “vehículo”, mediante solución salina equilibrada de HANKS, en lugar de plaquetas, en aras de confirmar el rol de las plaquetas en la generación de trombina.

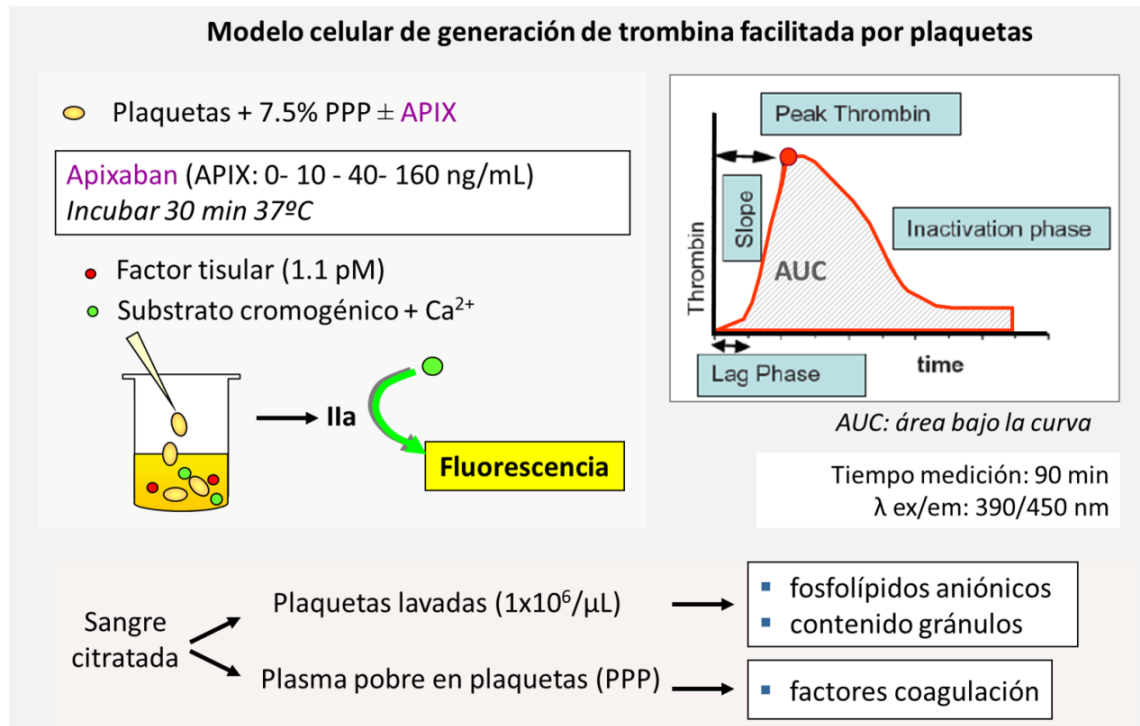


Figura 9. Esquema del experimento de la generación de trombina en el modelo celular de la coagulación mediado por plaquetas.

Estadística

Los datos se expresan como media ± error estándar de la media (SEM). Se utilizó el paquete estadístico SPSS 17.0.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) para los análisis. El análisis estadístico se realizó utilizando la t de Student para muestras apareadas después del test de Wilcoxon-Mann-Whitney para la distribución de Gauss. Los niveles mínimos de significación estadística se establecieron en $p < 0,05$.

RESULTADOS

En esta sección se incluyen los resultados derivados de la presente tesis:

- I. **Pujadas-Mestres L, Escolar G, Arellano-Rodrigo E, Galán AM.** *Apixaban in the prevention of stroke and systemic embolism in nonvalvular atrial fibrillation. Drugs Today (Barc).* 2013;49(7):425-36.
- II. Diseño y optimización de un modelo celular de generación de trombina facilitada por plaquetas. Datos no publicados.
- III. **Pujadas-Mestres L, Lopez-Vilchez I, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Lopez-Farre A, Diaz-Ricart M, Badimon JJ, Escolar G.** *Differential Inhibitory Action of Apixaban on Platelet and Fibrin Components of Forming Thrombi: Studies with Circulating Blood and in a Platelet-Based Model of Thrombin Generation.* PLoS One. 2017 Feb 13;12(2):e0171486.

La versión final de las publicaciones generadas a raíz de los resultados de la presente tesis puede consultarse en la sección ANEXO.

RESULTADOS I

Apixaban en la prevención del ictus y la embolia sistémica en fibrilación auricular no valvular

Pujadas-Mestres L, Escolar G, Arellano-Rodrigo E, Galán AM.

Drugs Today (Barc). 2013;49(7):425-36.

Objetivo

Actualizar la información disponible sobre apixaban en la prevención del ictus y de la embolia sistémica en pacientes con FANV, en todas su subpoblaciones, mediante la publicación de un manuscrito indexado.

Principal hallazgo

Apixaban ha demostrado eficacia y seguridad en profilaxis y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa sometidos a cirugía ortopédica mayor, y en la prevención del ictus en pacientes con FANV. La eficacia y seguridad de apixaban en los últimos ensayos clínicos fue consistente a través de varios análisis de subgrupos. Posteriormente, se ha demostrado la eficacia y seguridad de apixaban para el tratamiento agudo y extendido de la TEV, como para la prevención extendida de recurrencias de TEV. Teniendo en cuenta los buenos resultados de apixaban, sería procedente investigar la posible sinergia de un tratamiento combinado antiplaquetario con apixaban en el marco del SCA.

ANTECEDENTES

La FA es la arritmia más frecuente. Más de 7 millones de personas en los EE.UU. y la UE pueden verse afectados por algún tipo de arritmia y la prevalencia de esta patología continúa aumentando como la esperanza de vida sigue aumentando en los países desarrollados (116). La prevalencia de FA aumenta dramáticamente con la edad. El diez por ciento de la población con ≥ 80 años puede sufrir de FA (46). El ictus es la principal complicación tromboembólica de FA. Los pacientes con FA tienen un riesgo de 2 a 7 veces mayor de padecer un ictus isquémico, con un aumento de 2 veces en la mortalidad y con un riesgo subsecuente de deterioro cognitivo incapacitante (117). El ictus debido a FA es más incapacitante que el ictus debido a otras causas y tiene una mayor tasa de recurrencia. Del 15% al 30% de los individuos que sobreviven a un ictus están permanentemente incapacitados (118). Se ha acordado que el mundo se enfrenta a una creciente epidemia de FA y el ictus relacionado (117) (44).

Las complicaciones tromboembólicas en FA son el resultado de una condición de hipercoagulabilidad en desarrollo en la aurícula del corazón. En la trombogénesis de la FA se han implicado las dimensiones de la aurícula y la interrupción de la circulación sanguínea normal, la cual conlleva a un flujo turbulento y alteraciones en la pared auricular (61). Alteraciones congénitas y adquiridas en los mecanismos de coagulación o una deficiente regulación de los anticoagulantes naturales pueden contribuir aún más al desarrollo de un ambiente procoagulante (119). Sin duda, la cascada de coagulación está implicada en la formación del trombo venoso, arterial o auricular. En el moderno modelo celular de la hemostasia, la coagulación se inicia mediante el complejo FT/FVIIa en la superficie de una célula que contiene el FT e implica tres fases integradas: iniciación, amplificación y propagación (120). El FXa desempeñará un papel predominante en las fases de iniciación y propagación durante la activación de la coagulación basada en el modelo celular. La inhibición de las etapas de coagulación aportadas por FXa ha demostrado ser un mecanismo muy eficaz para modular la generación de trombina excesivo (121). La inhibición de FXa durante la etapa de iniciación reduce la generación inicial de trombina mediante la activación del complejo FXa-FVa en la superficie celular. Además, la inhibición de FXa durante el paso de

propagación impide la generación de trombina producida a través del conjunto del complejo de protrombinasa (FVa-FXa y calcio).

La prevención del ictus es el objetivo clave en el tratamiento de la FA. La experiencia clínica abrumadora demuestra que el riesgo de ictus debido a FA se puede reducir en dos terceras partes con anticoagulación eficaz (117). La anticoagulación oral basada en los AVK, ha demostrado ser eficaz en la prevención del ictus en FA, aunque sus principales inconvenientes incluyen, su estrecha ventana terapéutica, la gran variabilidad inter e intra-individual de la dosis-respuesta, un lento inicio y final de acción, la necesidad de un seguimiento y una amplia interacción con alimentos y medicamentos (10). Se necesitan nuevas estrategias con mecanismos de acción más específico, más amplio rango terapéutico y con interacciones farmacológicas menores para optimizar la prevención del ictus isquémico embólico mortal o incapacitante causada por la FA (122) (123) (11).

La inhibición del FXa es una manera eficaz de prevenir la generación de trombina tanto en la fase de iniciación como en la de propagación de los mecanismos de coagulación. Apixaban es un nuevo anticoagulante oral con una acción inhibitoria directa y específica sobre FXa y con demostrada seguridad y eficacia en la profilaxis y tratamiento de la TEV en varios ensayos clínicos con miles de pacientes. Esta revisión proporcionará una actualización de la información básica sobre la farmacología y farmacocinética de apixaban, e intentará poner en perspectiva el resultado de los recientes ensayos clínicos que han evaluado comparativamente el potencial antitrombótico de apixaban frente a los tratamientos antitrombóticos estándar en pacientes con FANV.

QUÍMICA

Apixaban (BMS 562247; PM-460) es un inhibidor selectivo y reversible directo del FXa. Apixaban se une al sitio activo de FXa con una afinidad elevada ($K_i = 0,08$ nM) y ejerce sus mecanismos anticoagulantes y antitrombóticos independientemente de la antitrombina (124). Apixaban es un fármaco directo que no requiere biotransformación anterior para convertirse en activo. La síntesis de apixaban ha sido descrita en detalle (125).

FARMACOLOGÍA PRECLÍNICA

La acción anticoagulante *in vitro* del apixaban se ha investigado en el plasma de ratas, conejos, perros y chimpancés. Apixaban prolonga eficazmente el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el tiempo de trombina (TT) y el Hep-test (126) (127). La capacidad de apixaban para inhibir el FXa o modificar las pruebas de coagulación varía entre las diferentes especies. Las concentraciones requeridas para duplicar el TP y el TTPa en la rata son 7,9 y 20 mM, respectivamente. Las concentraciones de apixaban desde 3,6 a 7,4 M añadidas *in vitro* en plasma humano son capaces de duplicar los valores de TP y TTPa. Apixaban inhibe la generación de trombina en plasma humano con una relación dosis-efecto de 5 nM a 400 nM con una IC₅₀ de 70 a 100 nM (128).

La acción antitrombótica de apixaban se ha demostrado en varios modelos experimentales. En ratas, apixaban inhibe la formación de trombos en territorios vasculares arteriales y venosos con ED₅₀ equivalente a 0,72 o 1,55 mg/kg/h, respectivamente. Apixaban ha demostrado tener una acción antitrombótica en un modelo de derivación arterio-venosa en conejos (126). En un modelo experimental de trombosis venosa en conejos, las concentraciones de apixaban equivalente a 65 nM redujeron el tamaño del trombo original hasta un 50%, sin prolongaciones significativas en los tiempos de sangrado (129). En los modelos anteriores, la actividad antitrombótica mostró alteraciones en las pruebas de coagulación de rutina (TTPa, TT y TP).

Se observó un índice terapéutico favorable para apixaban en estudios comparativos con inhibidores de trombina en un modelo de trombosis venosa en conejos (129). Se identificó una eficacia antitrombótica similar entre apixaban, rivaroxaban y dabigatran en la prevención y tratamiento de la trombosis venosa en un modelo de conejo. Los animales tratados con apixaban o rivaroxaban presentaron tiempos de sangrado más cortos en comparación con dabigatran a dosis antitrombóticas equivalentes. Apixaban ha mostrado una potencia significativa para inhibir la actividad de FXa unida al coágulo (130). Apixaban inhibe la agregación plaquetaria inducida por el FT. La agregación de plaquetas por el FT se desencadena por la trombina generada durante la interacción del FT con FVIIa y FXa en la superficie de las

plaquetas. La acción inhibitoria de apixaban en este marco experimental fue similar a la de otros inhibidores específicos de FVIIa o FIIa (131).

A pesar de que los nuevos anticoagulantes orales se han diseñado para evitar la necesidad de controles repetidos necesarios para el tratamiento anticoagulante clásico basado en AVK, ocasionalmente se podría solicitar una valoración de laboratorio para los nuevos anticoagulantes (132). A diferencia de los AVK, apixaban no necesita repetidos ajustes de dosis. En caso necesario, el efecto anticoagulante de apixaban se podría medir, incluso en concentraciones muy bajas en plasma, usando un ensayo estándar de laboratorio anti-Xa cromogénico con calibradores para heparinas de bajo peso molecular (HBPM) o apixaban (133).

La falta de antídotos específicos para revertir las alteraciones de la hemostasia inducidas por los nuevos anticoagulantes orales en caso de emergencias es un motivo de preocupación. Estudios recientes en un modelo *in vitro* de trombosis, con circulación de sangre humana, sugieren que los concentrados de complejo de protrombina o el rFVIIa podría revertir eficazmente la acción antihemostática de apixaban (134).

FARMACOCINÉTICA Y EL METABOLISMO

Después de la administración oral, el 50-66% de apixaban se absorbe por el estómago y el intestino delgado. Apixaban se halló como el principal componente circulante en plasma, siendo el sulfato O-desmetil de apixaban el metabolito más importante. La dosis administrada se recuperó en heces y orina con el fármaco original que representa aproximadamente la mitad de la dosis recuperada. La excreción biliar representó una vía de eliminación menor. Las vías metabólicas identificadas para apixaban incluyeron O-desmetilación, hidroxilación y sulfatación de O-desmetil apixaban hidroxilado (135) (136).

La C_{max} se alcanza de 1 a 3 horas tras la administración oral. Después de la dosis oral única de 5 mg, la C_{max} alcanzada es equivalente a 104 ng/mL (110). Un 87% del total de apixaban administrado se encuentra unido a proteínas. Tal como ya se observó en estudios previos en animales de experimentación, las elevaciones dosis-dependientes en niveles plasmáticos de apixaban se correspondieron con las prolongaciones de TTPa y TP. Tras la administración oral de múltiples dosis de apixaban, las concentraciones

aumentaron ligeramente por encima de los niveles observados después de la administración única, con un factor de acumulación de 1,3 a 1,9 (111). La C_{max} para la dosis de 5 mg/12 horas se incrementó ligeramente en comparación con la dosis de 10 mg en una sola administración. La concentración de apixaban alcanzó el estado estacionario después de 3 días, con una vida media de aproximadamente 9-14 horas.

Apixaban se oxida a través de mecanismos dependientes de CYP3A4 y en menor medida mediante las isoenzimas CYP2J2 y CYP1A2. El potencial de apixaban para inhibir o inducir CYP o para generar metabolitos activos es mínimo. Apixaban es un sustrato de CYP3A4 y de la P-glicoproteína (P-gp). Los inhibidores de CYP3A4 y de la P-gp aumentan la exposición de apixaban por lo que se aumentaría el riesgo de hemorragia. Asimismo, los inductores de CYP3A4 y de la P-gp disminuyen la exposición de apixaban y aumentarían el riesgo de trombosis (137). Por lo tanto, no se recomienda la administración de apixaban para los pacientes que reciben tratamiento sistémico concomitante con inhibidores potentes de CYP3A4 o de la P-gp, tal como ketoconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol, o ritonavir (138). Estos medicamentos pueden duplicar la exposición total de apixaban. Ésta podría realizarse aún más en presencia de factores adicionales que aumentan los niveles circulantes de apixaban (por ejemplo, la disfunción renal). Por otro lado, la administración concomitante de apixaban con potentes inductores de CYP3A4 y de la P-gp (rifampicina, fenitoína, carbamazepina, fenobarbital o la hierba de San Juan) podrían causar una reducción de casi el 50% en los niveles de apixaban. La administración concomitante de apixaban con estos últimos fármacos se debería realizar con precaución (138). Apixaban no parece tener potenciales interacciones con digoxina, pero se aconseja precaución para aquellos grupos de pacientes que reciben tratamiento concomitante con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluyendo la AAS. No se recomienda el uso concomitante con otros inhibidores de agregación plaquetaria u otros agentes antitrombóticos. La eficacia y seguridad de apixaban frente a warfarina fue consistente en pacientes con o sin tratamiento concomitante con amiodarona (139).

La eliminación de apixaban implica múltiples mecanismos, incluyendo el metabolismo y la excreción biliar y renal del fármaco no modificado. El aclaramiento renal representa un 27% del aclaramiento total. La ingesta de alimentos no afectó a la

C_{max} o el área bajo de la curva (ABC) de apixaban (110). La ingesta de alimentos que contienen altos contenidos de grasas o calorías no tiene ningún efecto sobre la eficacia de apixaban (137). La C_{max} no se ve afectada por la insuficiencia renal leve o moderada. No hay necesidad de ajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal leve a moderada; sin embargo, debido a la falta de evidencia clínica, apixaban no se recomienda en pacientes con aclaramiento de creatinina inferior a 15 mL/min o en aquellos con insuficiencia hepática grave. Apixaban se debe utilizar con precaución en pacientes con insuficiencia hepática leve o moderada (pacientes con Child-Pugh A o B). La Tabla I resume las características farmacológicas y farmacocinéticas que se detallan en el texto anterior.

Tabla I. Resumen de las características farmacológicas y farmacocinéticas de apixaban.

Variables	Propiedades
Referencia, Peso Molecular	BMS 562247-01; $C_{25}H_{25}N_5O_4$, MW 459.49
Nombre comercial; Licenciador	Eliquis®; Bristol Myers Squibb, Pfizer
Mecanismo de acción; Especificidad	Inhibición directa del Factor Xa; no pro-fármaco
Farmacología	Acción antitrombótica en diferentes modelos animales
Alteración de los test de coagulación	TP, TTPA, TTm y Hep-test
Medición de laboratorio	Test anti-Xa con calibrador apropiado
Inhibición de la generación de trombina (IC_{50})	75-100 μ M
Dosis terapéutica	2.5, 5 mg/12 h
Farmacocinética: T_{max} / vida media	1-3 h / 9-14 h
Farmacocinética C_{max} a dosis terapéuticas	100 ng/mL después de una única dosis terapéutica Ligeramente más elevada después de múltiples dosis terapéuticas
Biodisponibilidad	Vida media: 9-14 horas
Eliminación	25% Excreción renal, 50% heces
Interacciones con citocromos y P-gp	CYP3A4 and P-gp
Inductores potentes del CYP3A4 y la P-gp podrían reducir la exposición a apixaban (riesgo de trombosis)	Rifampicina, carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, o la hierba de San Juan
Inhibidores potentes del CYP3A4 y la P-gp podrían incrementar la exposición a apixaban (riesgo de sangrado)	Ketoconazol, itraconazol, ritonavir, o claritromicina
Reversión de la acción antihemostática	PCCs, rFVIIa, aPCCs

ESTUDIOS CLÍNICOS

Tromboprofilaxis venosa

Los pacientes sometidos a dos intervenciones quirúrgicas frecuentes, como la cadera o de rodilla, están en riesgo elevado de desarrollar complicaciones tromboticas.

La protección contra las complicaciones tromboembólicas alcanzadas con HBPM está perfectamente establecida en estas situaciones clínicas. La demostración de tasas adecuadas en prevención de trombosis en pacientes sometidos a artroplastia de cadera o de rodilla en comparación con la terapia antitrombótica estándar con HBPM es un concepto de prueba para cualquier nuevo anticoagulante. Los resultados de los estudios preliminares de fase II en el índice de utilidad terapéutica para apixaban indicaron que el régimen de dosificación de apixaban de 2,5 mg dos veces al día (BID) podría proporcionar el índice de utilidad terapéutica más alto (140).

Tres estudios de fase III evaluaron la eficacia y seguridad de apixaban en la prevención de la trombosis en pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor (Tabla II). Los estudios nombrados bajo el acrónimo de ADVANCE (*Apixaban Dose orally Versus ANTiCoagulation with Enoxaparine*) incluyeron más de 11.000 pacientes y la eficacia de apixaban oral a 2,5 mg BID se comparó con la de enoxaparina subcutánea a 30 mg BID o 40 mg una vez al día (141) (142) (143). El resultado de estos ensayos clínicos ha confirmado la eficacia de apixaban frente al tratamiento estándar para la prevención de tromboembolismo venoso (TEV) con enoxaparina (144). En el estudio ADVANCE-1, enoxaparina (30 mg BID tal como se utiliza en los EE.UU.) o apixaban, se iniciaron a las 12-24 horas después de la cirugía de reemplazo total de rodilla (141). En este estudio, apixaban no alcanzó el criterio de no inferioridad para la variable principal de eficacia en comparación con enoxaparina, aunque mostró una menor tasa de complicaciones hemorrágicas importantes y clínicamente no relevantes que enoxaparina. Los estudios ADVANCE-2 y ADVANCE-3 evaluaron la eficacia y seguridad de apixaban en la prevención de TEV en pacientes sometidos a cirugía electiva de reemplazo o artroplastia total de rodilla (ATR) o de cadera (ATC), respectivamente. En estos estudios, apixaban demostró la no inferioridad y la superioridad incluso para el objetivo primario de eficacia (compuesto de la trombosis venosa profunda sintomática o asintomática, embolia pulmonar no fatal y mortalidad por cualquier causa), y asimismo, fue superior en el objetivo secundario para la prevención de TEV mayor (141,143). Las complicaciones hemorrágicas observadas en estudios previos fueron similares para apixaban y enoxaparina.

Tabla II. Resumen de los ensayos Clínicos con apixaban en la prevención de complicaciones tromboembólicas.

Objetivo	Escenario clínico y fármaco comparador	Nº de pacientes
Selección de dosis	Utilidad terapéutica de apixaban en la prevención del tromboembolismo venoso	<i>Model-based</i>
Trombopprofilaxis Venosa después de cirugía ortopédica	Apixaban vs enoxaparina; cirugía electiva de reemplazo de rodilla (ADVANCE 1)	3.195
	Apixaban vs enoxaparina; cirugía electiva de reemplazo de rodilla (ADVANCE-2)	3.057
	Apixaban vs enoxaparina; cirugía electiva de reemplazo de cadera (ADVANCE-3)	3.866
Prevención de complicaciones tromboembólicas en pacientes con fibrilación auricular	Apixaban vs. aspirina (ASA): fibrilación auricular (AVERROES)	5.599
	Apixaban vs. warfarina: fibrilación auricular (ARISTOTLE)	18.201

Ictus asociado a fibrilación auricular

Los principales factores de riesgo para el ictus en personas con FA son ictus previo, edad avanzada, antecedentes de hipertensión, presión arterial sistólica >160 mmHg y diabetes. El riesgo de ictus relacionado con la FA puede ser estimado mediante el CHADS₂ (incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, edad >75 años, diabetes mellitus, ictus o accidente isquémico transitorio [AIT] previo, o tromboembolismo) o el CHA₂DS₂VASc (CHADS₂ score modificado, donde se incluyen: enfermedad vascular, edad 65-74, categoría Sexo, mujer) score, los cuales representan las puntuaciones en una escala que va de 1 a 6 o de 1 a 9, respectivamente; el impacto total combinado de los factores anteriores (117). El riesgo de hemorragia implícito de la exposición a los AVK, la complejidad de gestión y las numerosas interacciones de los anticoagulantes orales clásicos ha hecho que no todos los pacientes con FA con riesgo tromboembólico sean tributarios a recibir el tratamiento anticoagulante (145). Antes de la introducción de los ACODs, la única alternativa a un AVK con indicación para FA fue la terapia antiplaquetaria con AAS, a pesar de que esta alternativa fuera menos eficaz que un AVK para la prevención del ictus.

La eficacia y seguridad de apixaban oral para la prevención del ictus en la FANV se investigó en dos grandes ensayos aleatorios de fase III, doble ciego (Ver Tabla II). El primer ensayo, AVERROES, fue diseñado para hacer frente a la gran necesidad no cubierta de los pacientes con FANV y riesgo de ictus, que no son adecuados para, o no están dispuestos a tomar un AVK. Por lo tanto, en este ensayo se comparó la eficacia de

apixaban frente a la AAS en pacientes con FANV y al menos 1 factor de riesgo para ictus que fracasaron o no fueron adecuados para el tratamiento con AVK (145). El segundo ensayo, ARISTOTLE se diseñó para determinar si apixaban era no-inferior a warfarina en la reducción del objetivo combinado de ictus (isquémico o hemorrágico) y embolia sistémica en pacientes con FANV y al menos 1 factor de riesgo adicional para el ictus (146).

Apixaban frente a ácido acetilsalicílico en FA: El ensayo AVERROES

El ensayo AVERROES (*Apixaban Versus Acetylsalicylic Acid to Prevent Stroke in Atrial Fibrillation*) fue diseñado para comparar la eficacia y seguridad de apixaban frente a AAS en pacientes con FANV y que, por diversas razones, no eran candidatos a warfarina (13). Este estudio doble ciego, con doble emmascaramiento incluyó 5.599 pacientes que fueron aleatorizados para recibir apixaban 5 mg BID o AAS a una dosis de 81-324 mg al día. La variable principal de eficacia fue la aparición de ictus (isquémico y hemorrágico) o embolia sistémica. Antes del reclutamiento, el 40% de los pacientes había utilizado un AVK.

Tabla III. Resultados de eficacia y seguridad en el ensayo AVERROES (13).

Resultado	Apixaban (N=2.808)		Aspirina (N=2.791)		HR con apixaban (95% IC)	P Valor
	Nº de pacientes con primer evento	Tasa de eventos %/año	Nº de pacientes con primer evento	Tasa de eventos %/año		
Ictus o embolismo sistémico	51	1.6	113	3.7	0.45 (0.32-0.62)	<0.001
Ictus	49	1.6	105	3.4	0.46 (0.33-0.65)	<0.001
Isquémico	35	1.1	93	3.0	0.37 (0.25-0.55)	<0.001
Hemorrágico	6	0.2	9	0.3	0.67 (0.24-1.88)	0.45
Muerte por cualquier causa	111	3.5	140	4.4	0.79 (0.62-1.02)	0.07
Sangrado mayor	44	1.4	39	1.2	1.13 (0.74-1.75)	0.57
Intracraneal	11	0.4	13	0.4	0.85 (0.38-1.90)	0.69
Gastrointestinal	12	0.4	14	0.4	0.86 (0.40-1.86)	0.71

HR, Hazard Ratio; IC, Intervalo de Confianza

Se registraron 51 eventos para el objetivo primario en los pacientes de apixaban y 113 entre los asignados a AAS. Las tasas de mortalidad no difirieron estadísticamente en ambos grupos (3,5% por año en el grupo apixaban frente a 4,4% por año en el grupo de AAS). Hubo 44 casos de sangrado mayor en el grupo de apixaban y 39 en el grupo de

AAS; 11 casos de hemorragia intracraneal con apixaban y 13 con AAS. El riesgo de una primera hospitalización por causas cardiovasculares se redujo significativamente con apixaban en comparación con AAS (Tabla III). Como se comentará más adelante en el texto, los efectos del tratamiento fueron consistentes entre los subgrupos importantes. En resumen, en los pacientes con FANV para quienes el tratamiento AVK no era adecuado, apixaban redujo el riesgo de ictus o embolia sistémica sin aumentar significativamente el riesgo de sangrado mayor o hemorragia intracraneal. El comité de datos y seguimiento de seguridad recomendó la terminación anticipada del estudio debido a un claro beneficio a favor de apixaban.

Apixaban frente warfarina en FA: El ensayo ARISTOTLE

En el ensayo ARISTOTLE (*Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation*) apixaban se comparó frente warfarina para la prevención del ictus o embolia sistémica en pacientes con FANV y al menos un factor de riesgo adicional para el ictus (14). Era un diseño doble ciego, con doble enmascaramiento, donde apixaban 5 mg BID se comparó con warfarina (*international normalized ratio* [INR] objetivo: 2,0 a 3,0) en 18.201 pacientes. El ensayo fue diseñado para demostrar la no-inferioridad de apixaban frente warfarina en la reducción de la tasa de ictus isquémico o hemorrágico, o embolia sistémica; con criterios de valoración secundarios para testar la superioridad con respecto al resultado primario y para las tasas de sangrado mayor y muerte por cualquier causa.

Tal como se resume en la Tabla IV, se observó una reducción significativa para el resultado de eficacia primaria, un compuesto de ictus isquémico o hemorrágico o embolia sistémica, frente warfarina (1,27% por año vs. 1,60% por año; hazard ratio [HR] con apixaban: 0,79; intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,66-0,95; $P < 0,001$ para la no-inferioridad, $P = 0,01$ para la superioridad). Además, la tasa de sangrado mayor ocurrió en el 2,13% de los pacientes que recibieron apixaban, y el 3,09% de los pacientes que recibieron warfarina (HR: 0,69; IC del 95%: 0,60-0,80; $P < 0,001$). Un hallazgo importante del estudio ARISTOTLE fue la reducción significativa en las tasas de ictus hemorrágico. Estos resultados indican que el tratamiento con apixaban podría resultar en una reducción de casi 50% en el desarrollo de uno de los efectos secundarios más graves

observados con las estrategias actuales AVK para la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes con FANV. Un análisis más detallado de los resultados reveló que en comparación a warfarina, apixaban se asoció con reducciones pequeñas pero significativas en la probabilidad de hospitalización en pacientes con FANV. Por cada 1.000 pacientes tratados con apixaban en lugar de warfarina, 13 pacientes evitaron la hospitalización una media de 1,5 veces durante el estudio (147).

Tabla IV. Resultados de eficacia y seguridad en el ensayo ARISTOTLE (14).

Resultado	Apixaban (N=9.120)		Warfarina (N=9.081)		HR con apixaban (95% IC)	P Valor
	Nº de pacientes con primer evento	Tasa de eventos %/año	Nº de pacientes con primer evento	Tasa de eventos %/año		
Ictus o embolismo sistémico	212	1.27	265	1.60	0.79 (0.66-0.95)	0.01
Ictus	199	1.19	250	1.51	0.79 (0.65-0.95)	0.01
Isquémico	162	0.97	175	1.05	0.92 (0.74-1.13)	0.42
Hemorrágico	40	0.24	78	0.47	0.51 (0.35-0.75)	<0.001
Muerte por cualquier causa	603	3.52	669	3.94	0.89 (0.80-0.998)	0.047
Sangrado mayor	327	2.13	462	3.09	0.69 (0.60-0.80)	<0.001
Intracraneal	52	0.33	122	0.80	0.42 (0.30-0.58)	<0.001
Gastrointestinal	105	0.76	119	0.86	0.89 (0.70-1.15)	0.37

HR, Hazard Ratio; IC, Intervalo de Confianza

El estudio ARISTOTLE concluyó que apixaban fue superior a la warfarina en la prevención de ictus o embolia sistémica, causó menos sangrado, y dio lugar a una menor mortalidad en pacientes con FANV (14). Una conclusión indirecta del ensayo anteriormente mencionado es que el tratamiento con apixaban ofrece un beneficio adicional para los pacientes con alto riesgo tromboembólico de acuerdo con la puntuación CHADS₂. Apixaban fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) para FANV en 2012 basado en los resultados del ensayo ARISTOTLE (148,149).

Eficacia y seguridad de apixaban en los subgrupos de pacientes con insuficiencia renal, ictus previo o el riesgo de sangrado

La enfermedad renal crónica (ERC) afecta hasta el 10% de la población adulta (150) y conlleva un alto riesgo para el desarrollo de la FA (151). En un gran estudio poblacional, el HR para el desarrollo de FA se duplicó para el grupo de pacientes con

ERC moderada en comparación con los pacientes con función renal normal independiente de otros factores de riesgo conocidos para la FA (152). A pesar de este aumento en el riesgo evidente de tromboembolismo asociado con la FA, muchos pacientes con disfunción renal no están recibiendo terapia anticoagulante oral (153), sobre todo debido al riesgo de hemorragia asociado al uso de warfarina (154).

A pesar de la ausencia de interacciones significativas de los subgrupos, se llevaron a cabo análisis secundarios de los ensayos AVERROES y ARISTOTLE para evaluar la eficacia y seguridad a través de diferentes subgrupos de pacientes según su función renal, el riesgo de ictus o su riesgo específico de sangrado (155,156). El ensayo AVERROES incluyó 1.697 (30%) de los pacientes con ERC en estadio III, donde las tasas de filtración glomerular estimadas medias (TFGe) fueron de 49 mL/min/1,73m², el cual fue un predictor independiente de eventos primarios (HR: 1,6; *P* = 0,01) y sangrado mayor (HR: 2,2; *P* = 0,02). Estos pacientes eran mayores (edad media 75 frente 68 años), y tenían hipertensión más frecuente, diabetes, insuficiencia cardíaca e ictus previo (todas las *P* < 0,01), en comparación con los pacientes con función renal normal (TFGe ≥60 mL/min/1,73 m²). La eficacia de apixaban fue consistente en estos subgrupos, con una reducción significativa de eventos primarios en un 68% (1,8% por año con apixaban frente 5,6% por año con AAS; *p* <0,001) para los pacientes con ERC en estadio III y en un 43% (1,6% por año con apixaban frente 2,8% por año con AAS; *P* = 0,009) en los pacientes con función renal normal. El tratamiento con apixaban se asoció con una diferencia no significativa en sangrado mayor para los pacientes con ERC en estadio III (2,5% por año con apixaban frente a 2,2% por año con AAS). Los resultados fueron similares en un análisis secundario del estudio ARISTOTLE (156). Este estudio incluyó 7.518 pacientes (42%) con un TFGe de >80 mL/min, 7.587 (42%) pacientes con un TFGe entre >50 y 80 mL/min, y 3.017 (15%) con una TFGe de ≤50 mL/min. Los pacientes con insuficiencia renal (≤80 mL/min) tuvieron una mayor tasa de eventos cardiovasculares y sangrado. En comparación con warfarina, la incidencia de ictus o embolia sistémica, sangrado mayor y mortalidad fue significativamente menor en los pacientes que recibieron apixaban con independencia de la función renal. De hecho, la reducción del riesgo de sangrado mayor fue mayor en los pacientes con un TFGe de ≤50 mL/min (*P* = 0,005).

Está bien establecido que los pacientes con FA e ictus previo o AIT tienen un alto riesgo de ictus. Para confirmar esta hipótesis y comparar la eficacia de apixaban en pacientes con y sin ictus previo o AIT, se realizó un análisis predefinido de subgrupos del AVERROES (157). En los pacientes con ictus previo o AIT, 2,39% de eventos de ictus o embolia sistémica al año ocurrieron en el grupo apixaban en comparación con el 9,16% en el grupo de AAS (HR: 0,29; IC del 95%: 0,15-0,60). Además, el sangrado mayor fue más frecuente en pacientes con antecedentes de ictus o AIT que en pacientes sin (HR: 2,88; IC del 95%: 1,77-4,55) pero el riesgo para este evento no fue diferente entre los grupos de tratamiento.

En el análisis de subgrupos del ARISTOTLE de pacientes con ictus previo o AIT, la incidencia de ictus o embolia sistémica fue de 2,46 por 100 pacientes-año en el grupo de apixaban y 3,24 en el grupo de warfarina (HR: 0,76; IC del 95%: 0,56-1,03) (158). Sin embargo, las diferencias no alcanzaron los niveles de significación estadística en los pacientes sin ictus previo o AIT (1,01 por 100 pacientes-año con apixaban y 1,23 con warfarina; HR: 0,82, IC del 95%: 0,65-1,03). Por lo tanto, la reducción absoluta de la tasa de ictus y embolia sistémica con apixaban en comparación con warfarina fue de 0,77 por 100 pacientes-año (IC del 95%: 0,08-1,63) en los pacientes con ictus previo o AIT y 0,22 (IC del 95%: 0,03-0,47) en aquellos sin ictus previo o AIT. La incidencia de sangrado mayor fue similar en pacientes con y sin antecedentes de ictus o AIT según el tratamiento recibido (1,07 por 100 pacientes-año con apixaban [IC 95%: 0,09-2,04] frente 0,93 con warfarina [IC 95%: 0,54-1,32]). Los investigadores concluyeron que apixaban fue particularmente eficaz para los pacientes con ictus previo o AIT.

El tratamiento con anticoagulantes aumenta el riesgo de sangrado para la población expuesta de los pacientes. El riesgo de hemorragia asumido con anticoagulantes debe ser equilibrado respecto al riesgo subyacente de ictus en ausencia de tratamiento (159). El riesgo de ictus se puede evaluar a través de la puntuación CHADS₂. Una evaluación similar ha sido aplicada para evaluar el riesgo de sangrado. De este modo, la puntuación HAS-BLED (hipertensión, función renal/hepática anormal, ictus, historia o predisposición de sangrado, INR lábil, edad avanzada, fármacos o alcohol) ha sido validada para las cohortes de pacientes sometidos a tratamientos

anticoagulantes. Una puntuación HAS-BLED de >3 identifica a los pacientes con FA en alto riesgo de sangrado (160).

En un subanálisis del ensayo AVERROES, apixaban redujo las tasas de ictus con riesgo de sangrado comparable cuando se compara con AAS (161). Por lo tanto, las tasas tanto de ictus y sangrado incrementaron con las puntuaciones más altas de CHADS₂, pero apixaban comparado con AAS se asoció con un riesgo similar del sitio anatómico de sangrado y una reducción del riesgo relativo de ictus. Lip et al. realizaron un análisis secundario del estudio AVERROES para confirmar que no hubo heterogeneidades significativas en el riesgo de sangrado entre los grupos tratados (162). Los resultados fueron consistentes independientemente del riesgo inicial. Apixaban fue superior a AAS para la prevención del ictus en la población de AF, con tasas similares de sangrado mayor, en presencia de uno o más factores de riesgo de ictus, de modo consistente con el efecto del tratamiento por las puntuaciones CHADS₂/CHA₂DS₂-VASc. Un análisis secundario del ARISTOTLE confirmó que la reducción del riesgo relativo de hemorragia intracraneal tendió a ser mayor en pacientes con HAS-BLED de ≥ 3 (HR: 0,22; IC del 95%: 0,10-0,48) que en aquellos con HAS-BLED de 0-1 (HR: 0,66; IC del 95%: 0,39-1,12; *P* de interacción = 0,0604) (163). Por lo tanto, apixaban presenta beneficios en comparación con warfarina que son consistentes a lo largo de todo el espectro de pacientes según el riesgo de ictus y sangrado mediante los CHADS₂, CHA₂DS₂VASc, y HAS-BLED scores.

CONCLUSIONES

La FA y las complicaciones trombóticas relacionadas son importantes contribuyentes a la mortalidad y morbilidad en nuestra sociedad, y representan un importante problema de salud. La prevalencia y la incidencia de FA en constante aumento están obligando a contribuir a un aumento progresivo de la carga social y económica del ictus y discapacidades relacionadas. Apixaban es un nuevo anticoagulante oral con una acción inhibitoria directa, específica y reversible del FXa. Apixaban ofrece varias ventajas sobre los clásicos AVK: los efectos son fiables en dosis ajustadas, controles repetidos son innecesarios y su reducida vida media predice una recuperación relativamente rápida de los mecanismos de coagulación después de

suspender el tratamiento. Además, apixaban muestra menores interacciones con alimentos u otros fármacos y su metabolismo parece ser menos dependiente de los polimorfismos relacionados con el citocromo. Apixaban ha demostrado seguridad y eficacia en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa, y en la prevención de complicaciones tromboembólicas en pacientes con FANV en varios estudios clínicos con miles de pacientes. Con base en los resultados del estudio ARISTOTLE, la FDA y la EMA han aprobado recientemente apixaban para la prevención de complicaciones tromboembólicas en pacientes con FANV (148,149). Dos ensayos clínicos de fase III han investigado la eficacia y seguridad de apixaban para el tratamiento agudo y extendido de la TEV, tanto la trombosis venosa profunda (TVP) y la embolia pulmonar (EP) (164,165). Basados en los resultados de estos ensayos, la compañía licenciadora podría planear iniciar los procesos regulatorios para obtener la aprobación de nuevas indicaciones en el tratamiento agudo y extendido de la TEV, como para la prevención extendida de recurrencias de TEV.

RESULTADOS II

Diseño y optimización de un modelo celular de generación de trombina facilitada por plaquetas

Objetivo

Las plaquetas juegan un papel clave en el modelo celular de la coagulación, favoreciendo la generación de trombina. Nos propusimos diseñar un ensayo que permita medir la contribución de las plaquetas a la generación de trombina.

Principal hallazgo

Hemos adaptado y optimizado un ensayo fluorimétrico de generación de trombina capaz de medir, de forma relativamente sencilla, la generación de trombina facilitada por plaquetas.

ANTECEDENTES

Las plaquetas juegan un papel clave en el modelo celular de la coagulación, favoreciendo la generación de trombina. Sin embargo, no hay herramientas tecnológicas estandarizadas que permitan medir la contribución de las plaquetas a la generación de trombina.

En estudios previos, investigadores del grupo donde el doctorando ha realizado esta tesis doctoral publicaron que suspensiones de plaquetas lavadas agregaban reversiblemente en presencia de FT expuesto en microvesículas, y que estas plaquetas en presencia combinada de FT y factor FVII activado recombinante (FVIIar), mostraban un primer pico de agregación reversible que cuando comenzaba a desagregarse daba lugar a una segunda fase de agregación irreversible (figura 1A). Mediante distintas estrategias inhibitoras (figura 1B), los investigadores determinaron que la segunda fase de agregación era dependiente de trombina, que se generaba *in situ* (166).

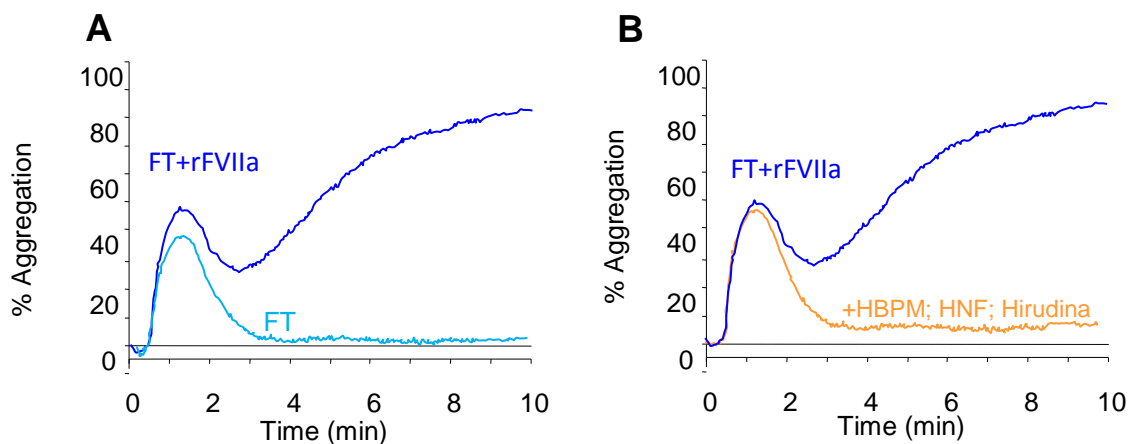


Figura 1. Perfiles de agregación plaquetaria iniciada por factor tisular (TF) en presencia y ausencia FVIIar, añadidos a suspensiones de plaquetas lavadas (A). Las estrategias inhibitoras con hirudina, heparina de bajo peso molecular (HBPM) y heparina no fraccionada (HNF) demuestran que la segunda fase de agregación con TF y FVIIar depende de trombina. **Adaptación de Lopez-Vilchez I, Thromb Haemost 2007 (166).**

PRIMERA VERSIÓN DEL MODELO

Durante el diseño del modelo celular de generación de trombina con gran contribución de las plaquetas, escogimos como punto de partida las condiciones experimentales del trabajo mencionado (166). La generación de trombina se inició en

suspensiones de plaquetas lavadas a 1×10^6 plaquetas/ μL , tras la adición de FT (FT 550 pM final; Thromborel[®]S, Siemens Healthcare, Marburg, Alemania), FVIIar (Novoseven, Novonordisk; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final) y substrato fluorogénico que también contiene CaCl_2 (Technoclone GmbH, Viena, Austria). La fluorescencia generada se evaluó a una longitud de onda de 390/450 nm (excitación/emisión) durante 90 min, a intervalos de 1 min, y las unidades de fluorescencia fueron analizadas con el Software Thermo Fluoroskan Ascent (Technoclone GmbH). Los experimentos con estas condiciones revelaron cantidades de trombina generada bajas y muy variables ($31,5 \pm 8.1$ nM, alcanzados a los 50.9 ± 9.7 min; $n = 10$) lo cual no permitía tener un perfil lo suficiente fiable para evaluar efectos de posibles inhibidores de la generación de trombina.

Propusimos complementar la muestra con pequeñas cantidades de PPP que aportarían al sistema factores de la coagulación pero sin ser el principal componente. Evaluamos el efecto de añadir a las suspensiones de plaquetas lavadas un 5, 10 y 20% de PPP. La presencia de PPP resultó en mayor cantidad de trombina generada, con aceleración del tiempo de obtención del pico máximo de trombina, siendo estos cambios proporcionales al % de PPP añadido (Figura 2A). Atendiendo a los resultados, decidimos que 10% de PPP era una proporción óptima para no dar demasiado peso a la contribución del PPP pero obtener perfiles reproducibles que permitieran evaluar agentes capaces de afectar a la capacidad del sistema de generar trombina. Sin embargo, al repetir estos estudios sustituyendo las plaquetas por solución vehículo para confirmar el papel relevante de las plaquetas en este modelo observamos que, con esta combinación de agentes iniciadores, los perfiles de generación de trombina no mostraban diferencias significativas respecto a las muestras con plaquetas (figura 2B, Veh). Seguramente debido a que la gran cantidad de fosfolípidos aportados por las microvesículas compiten con las plaquetas.

SEGUNDA VERSIÓN DEL MODELO

Nuestra segunda aproximación experimental consistió en reducir 500 veces la concentración de FT (1.1 pM final) y eliminar el FVIIa, el cual vendría aportado junto a los factores de coagulación presentes en el plasma añadido a las suspensiones de plaquetas. Igual que en el primer modelo, bajo estas condiciones experimentales los

perfiles de generación de trombina en ausencia de PPP reiteraron su comportamiento variable, así como una mayor cantidad de trombina generada con aceleración de los parámetros cinéticos proporcionalmente al % de PPP añadido (5, 10 y 20 %). Estos cambios alcanzaban diferencias estadísticas entre las distintas muestras tal y como resume la tabla 1. Sin duda, lo más importante hallado en estos experimentos fue que en ausencia de plaquetas, con solución vehículo, se demostró un efecto del PPP por sí solo crítica y estadísticamente minimizado, indicando que los cambios observados se deben a la contribución de las plaquetas a la generación de trombina (Figura 2 C-D). Estos estudios confirmaron que el % óptimo de PPP estaría entre el 5% y el 10%.

VERSIÓN FINAL DEL MODELO

Una versión más restrictiva, reduciendo aún más la cantidad final de FT a 0.11 pM y el % PPP a 7.5 % dio lugar a la tercera versión del modelo de generación de trombina (ver tabla 1). Estas condiciones experimentales cumplían los requerimientos deseados para un modelo de generación de trombina con gran contribución de las plaquetas.

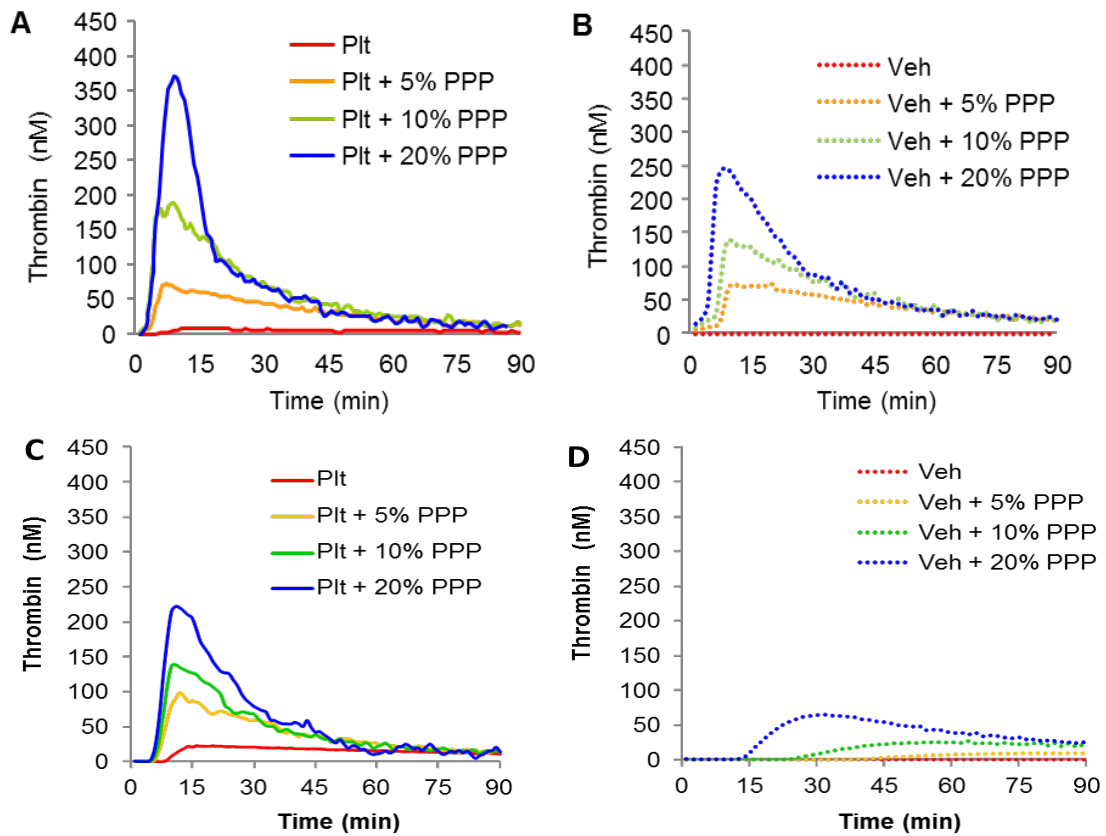


Figura 2. Perfiles representativos para las distintas versiones del modelo de generación de trombina con alta contribución de las plaquetas, en presencia de porcentajes crecientes de PPP, añadidos a suspensiones de plaquetas (Plt) o solución vehículo (Veh). A-B) Versión 1. Activación con FT (550 pM) + rFVIIa (5 μ g/mL) + sustrato fluorogénico con CaCl_2 . C-D) Versión 2. Activación con FT (1.1 pM) + sustrato fluorogénico con CaCl_2 .

Tabla 1. Parámetros de generación de trombina facilitada por las plaquetas con las distintas condiciones experimentales para la optimización del modelo desarrollado.

	Lag Phase (min)	Thrombin Peak (nM)	Thrombin Time (min)	Area Under Curve (A.U.C.)
MODELO 1: TF 550 pM + rFVIIa 5µg/mL				
PLT	3.9 ± 0.2	31.5 ± 8.1	50.9 ± 9.7	927.3 ± 119.6
PLT + 5% PPP	3.0 ± 0.0 *	79.8 ± 4.4 *	10.8 ± 3.1 *	3517.9 ± 158.2 *
PLT + 10 % PPP	3.0 ± 0.0 *	188.5 ± 20.1 *#	11.4 ± 2.7 *	4846.5 ± 180.4 *#
PLT + 20 % PPP	3.0 ± 0.0 *	301.8 ± 9.4 *#	7.0 ± 0.0 *	6891.0 ± 376.7 *#§
Veh	8.5 ± 0.9 †	0.3 ± 0.3 †	13.0 ± 13.0 †	0.9 ± 0.9 †
Veh + 5% PPP	3.0 ± 0.0 *	78.1 ± 1.2 *	13.3 ± 1.7	3796.0 ± 100.8 *
Veh + 10% PPP	3.0 ± 0.0 *	144.6 ± 3.6 *#	8.5 ± 0.6 #	5237.2 ± 95.3 *#
Veh + 20% PPP	3.0 ± 0.0 *	250.7 ± 4.1 *#§†	6.8 ± 0.5 #	7036.9 ± 13.8 *#§
MODELO 2: TF 1.1pM				
PLT	5.0 ± 0.4	35.7 ± 7.1	14.0 ± 1.1	1943.9 ± 337.7
PLT + 5% PPP	4.5 ± 0.3	97.5 ± 2.5 *	12.3 ± 0.5	3623.8 ± 128.6 *
PLT + 10 % PPP	4.3 ± 0.3	153.0 ± 9.4 *#	9.3 ± 0.9 *#	4214.0 ± 355.0 *
PLT + 20 % PPP	4.3 ± 0.5	215.5 ± 7.9 *#§	12.0 ± 1.1 *	6011.8 ± 404.3 *#§
Veh	24.8 ± 20.9	0.0 ± 0.0 †	1.3 ± 1.3 †	0.0 ± 0.0 †
Veh + 5% PPP	8.8 ± 1.2 †	26.2 ± 9.3 *†	61.5 ± 15.0 *†	1431.3 ± 618.4 †
Veh + 10% PPP	8.0 ± 1.8	59.1 ± 18.2 *#†	42.8 ± 10.8 *#†	2875.3 ± 896.2 *#
Veh + 20% PPP	7.8 ± 1.8	103.7 ± 22.5 *#§†	24.8 ± 3.4 *#†	4358.7 ± 687.4 *#§†
MODELO 3: TF 0.11pM				
PLT + 7.5 % PPP	7.0 ± 0.7	79.5 ± 4.0	20.8 ± 2.7	3140.8 ± 80.5
Veh + 7.5% PPP	14.7 ± 2.7 †	3.1 ± 1.0 †	49.8 ± 16.5	105.4 ± 52.9 †

Plt: Plaquetas; Veh: Vehículo.

Resultados expresados como Media ± Error Estándar de la Media (SEM)

* $p < 0.05$ vs. 0% PPP

$p < 0.05$ vs. 5% PPP

§ $p < 0.05$ vs. 10% PPP

† $p < 0.05$ vs. mismo %PPP con plaquetas

RESULTADOS III

Acción inhibitoria diferencial de apixaban sobre las plaquetas y la fibrina durante la formación del trombo: Estudios con sangre circulante y en un modelo de generación de trombina facilitada por plaquetas

Pujadas-Mestres L, Lopez-Vilchez I, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Lopez-Farre A, Diaz-Ricart M, Badimon JJ, Escolar G.

PLoS One. 2017 Feb 13;12(2):e0171486

Objetivo

Estudiar y cuantificar los efectos asociados a apixaban sobre diferentes aspectos de la formación del trombo, mediante aproximaciones experimentales con distintas condiciones de flujo.

Principales hallazgos

Concentraciones de apixaban 4 a 16 veces inferiores a la C_{max} , alcanzada con la dosis antitrombótica aprobada para FANV, podrían ser adecuadas para reducir la generación de trombina, la formación de agregados de plaquetas grandes y, aun así, permitir la formación de fibrina, preservando así su contribución a la hemostasia en el contexto del SCA. Nuestros resultados indican que los estudios experimentales en condiciones de flujo en combinación con los ensayos de la generación de trombina modificados podrían facilitar la selección de la concentración de ACOD.

INTRODUCCIÓN

Las plaquetas contribuyen a eventos precipitantes que conducen a la oclusión coronaria aguda (167). La rotura de la placa facilita la interacción de la sangre que fluye con los componentes internos de las lesiones ateroscleróticas, el colágeno y el FT entre ellos; que conduce a la generación de trombina local y la formación de trombos aguda (168). Los mecanismos por los que la ruptura de placa conduce a trombos oclusivos o no oclusivos son complejos y probablemente potenciados por la presencia y/o el transporte de plaquetas hiperreactivas y agonistas solubles, tales como trombina hacia el vaso lesionado (169). Los eventos oclusivos en los vasos arteriales se producen en una amplia gama de condiciones hemodinámicas, que van desde flujos extremos a deprimidos, incluyendo situaciones con turbulencias o estasis en vasos estenóticos patológicos.

Se ha propuesto que la exposición del FT vascular en placas ateroscleróticas rotas juega un papel crítico en la generación local de trombina favoreciendo el crecimiento de trombos oclusivos. El ensamblaje del complejo FT-FVIIa en los fosfolípidos aniónicos, expresado en las membranas celulares activadas, es importante para una óptima generación de trombina y coagulación de la sangre. Los modelos actuales de coagulación contemplan la implicación de los mecanismos celulares y enzimáticos en tres etapas diferenciadas: activación inicial, propagación y generación de trombina (170,5,120). Aunque el modelo celular de la coagulación más reciente no tiene en cuenta las condiciones de índices de cizalladura elevadas, generalmente implicadas en la aparición de eventos coronarios agudos, los conceptos de este modelo todavía pueden aplicar a los territorios arteriales post-estenóticos o durante la consolidación de trombos oclusivos que se caracteriza por flujo lento o incluso condiciones casi estáticas.

Las condiciones de flujo de sangre, y más específicamente los índices de cizalladura de la sangre, son esenciales en la fisiopatología de las complicaciones trombóticas venosas y arteriales (171). La interacción de las plaquetas con la pared del vaso dañado y la formación de trombos son procesos dependientes de la cizalladura (172). Además, las propiedades reológicas de la sangre ubican a las plaquetas circulantes cerca de la capa límite (*boundary layer*), donde reconocen e interactúan con los elementos del subendotelio expuesto al daño de los vasos. La ruptura de una placa

aterosclerótica, expondrá FT y colágeno a la circulación sanguínea y a las plaquetas, desencadenando la formación de un trombo y las consecuentes complicaciones isquémicas del SCA (37,173). El tamaño, la estabilidad y la composición de este trombo determinarán la gravedad del SCA (174,175).

Los trombos generados en una placa rota contienen plaquetas y fibrina (175). La activación inicial y la agregación plaquetaria son procesos importantes en la formación de trombos; sin embargo, su estabilidad depende de su contenido y polimerización de fibrina. Las lesiones ateroscleróticas alteradas se caracterizan reológicamente mediante el aumento de índices de cizalladura que alcanzan niveles máximos en el ápice de la estenosis. Estas condiciones de índices de cizalladura altos se magnifican por la naturaleza oclusiva de la formación del trombo en la lesión alterada. Desde localizaciones más distales al ápice, el índice de cizalladura local desacelera progresivamente e incluso cambiar a valores negativos debido a la turbulencia post-distal del trombo (176,177,178). Las condiciones de flujo reducidas en las partes proximales y distales de los trombos en crecimiento favorecen la generación de trombina local, por lo tanto, se aumenta la estabilidad de los trombos mediante la incorporación de plaquetas adicionales en una malla de polimerización de fibrina.

Los agentes antiplaquetarios y tratamientos anticoagulantes tales como heparinas han demostrado éxito clínico, a pesar de ello todavía se producen un número significativo de eventos recurrentes. Los anticoagulantes orales directos (ACODs) pueden considerarse igualmente eficaces que la warfarina, pero más seguros y más fáciles de usar. A pesar de estas ventajas, hay información limitada sobre los efectos de los ACODs en el marco del SCA; y la posible sinergia de un tratamiento combinado antiplaquetario más anticoagulante no se ha investigado en detalle (15). La actividad inhibitoria de los ACODs sobre la generación de trombina debe ser considerada como una ventaja importante; sin embargo, su efecto sobre la actividad procoagulante mediada por plaquetas no se ha explorado todavía. De hecho, algunos ensayos clínicos han demostrado resultados contradictorios en función de la dosis y el ACOD investigado (179).

En resumen, la activación plaquetaria, la generación de trombina local y la formación de fibrina son tres elementos clave que contribuyen a la formación de

trombos oclusivos en los territorios arteriales. Los mecanismos de acción de los ACODs apoyan su potencial uso terapéutico en la prevención de complicaciones trombóticas en el sistema vascular arterial, sin embargo los efectos de estos agentes sobre la activación y agregación plaquetaria no se han investigado en detalle. En el presente estudio, hemos aplicado aproximaciones experimentales en condiciones de flujo dinámico y estático para investigar los efectos de apixaban sobre diferentes aspectos de la formación de trombos. Más específicamente, se evaluó los efectos inhibidores de apixaban en: 1) la deposición de plaquetas y la formación de fibrina en una superficie trombogénica, en un modelo experimental de trombosis con sangre circulante a índices de cizalladura arteriales; 2) la cinética de formación de coágulos utilizando tromboelastometría; y 3) la generación de trombina aplicando un modelo celular de la coagulación basado por plaquetas.

RESULTADOS

Efectos de apixaban en trombo formado en condiciones de flujo

Se evaluaron los efectos de las concentraciones de apixaban sobre los componentes plaquetarios y de fibrina del trombo formado en condiciones de flujo. Como se resume en las **figuras 1A y 1B**, apixaban en concentraciones elevadas (160 ng/mL) demostró una potente acción inhibidora de la formación de fibrina con una reducción moderada en la deposición de plaquetas con diferencias que alcanzaron valores de significación estadística ($p < 0,01$ frente a los valores basales). No se observaron efectos inhibidores sobre la formación de fibrina con las concentraciones más bajas de apixaban ensayadas (10 y 40 ng/mL) (**figura 1B**).

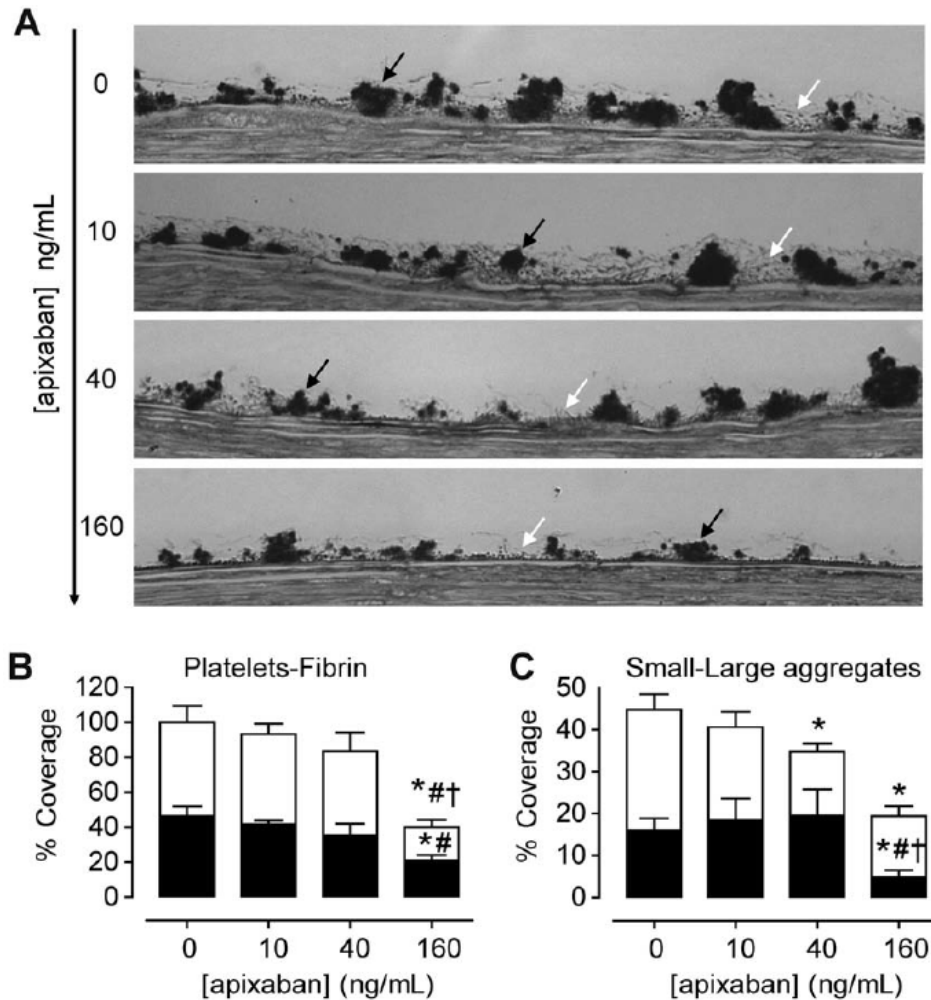


Fig. 1. Efectos de apixaban en las interacciones plaquetarias y de fibrina con los vasos dañados expuestos a la sangre circulante. En la concentración más alta, apixaban inhibió significativamente la incorporación de fibrina y plaquetas en los trombos en formación. No se observaron efectos inhibitorios sobre la formación de fibrina con apixaban en 40 o 10 ng/mL. Los efectos antiplaquetarios de apixaban fueron aún evidentes en 40 ng/mL. **(A)** Micrografías representativas que muestran las interacciones plaquetarias y de fibrina sobre las secciones transversales de los vasos perfundidos. La sangre citrada previamente incubada con diferentes concentraciones de apixaban (0, 10, 40 y 160 ng/mL) fue recalcificada e inmediatamente perfundida a un índice de cizalladura de 800 s^{-1} , durante 5 min. Las flechas negras señalan los agregados de plaquetas y las flechas blancas indican la fibrina (x1000 aumentos). **(B)** Los diagramas de barras representan resultados de las evaluaciones morfométricas en secciones transversales de los vasos perfundidos, donde muestran el porcentaje de superficie cubierta por los agregados de plaquetas (negro) o fibrina (blanco). **(C)** Los diagramas de barras representan la presencia de agregados de plaquetas pequeños (<5 micras de altura; negro) y grandes (>5 micras de altura; blancas). Los resultados se expresan como media \pm S.E.M. (n = 5). *p <0,01 vs. niveles basales (sin apixaban); #p <0,01 vs. apixaban 10 ng/mL y †p <0,01 vs. apixaban 40 ng/mL.

Un análisis más detallado de las características de los agregados de plaquetas formados sobre la superficie del vaso trombogénico reveló que apixaban interfirió en la formación de agregados de plaquetas más grandes (≥ 5 micras de altura) de un modo dosis-dependiente (**fig. 1C**). Como se muestra en los diagramas de barras, la reducción en la proporción de agregados más grandes resultó en una tendencia en asociar las plaquetas con agregados de plaquetas más pequeñas (<5 micrómetros de altura). Apixaban a 160 ng/mL no sólo reduce la superficie total cubierta por plaquetas, sino que también causó una reducción significativa en la formación de agregados de plaquetas más grandes ($14,6 \pm 1,9\%$ frente a $28,4 \pm 2,9\%$ en los controles; $p < 0,01$). Una tendencia similar se observó con 40 ng/mL con una reducción inferior pero estadísticamente significativa ($p < 0,05$). La concentración más baja de apixaban probada (10 ng/mL) no afectó significativamente a la formación o el tamaño de los agregados de plaquetas. Los resultados se resumen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Modificaciones en porcentajes de cobertura de plaquetas y fibrina, mediante el aumento de las concentraciones de apixaban, en estudios con sangre circulante.

[Apixaban] ng/mL	Porcentaje de superficie cubierta (%)			
	Plaquetas	Fibrina	Agr. grandes	Agr. pequeños
0	$46,6 \pm 3,5$	$53,8 \pm 7,4$	$28,4 \pm 2,9$	$14,6 \pm 2,6$
10	$42,1 \pm 2,5$	$51,2 \pm 3,5$	$22,7 \pm 2,0$	$18,1 \pm 3,4$
40	$35,5 \pm 4,8$ *	$46,9 \pm 6,3$	$15,71 \pm 1,3$ *†	$19,0 \pm 4,3$
160	$21,0 \pm 2,8$ *†§	$19,3 \pm 4,4$ *†§	$14,6 \pm 1,9$ *†	$4,0 \pm 1,8$ *†§

Agr. grandes: agregados de plaquetas grandes de >5 micras de altura

Agr. pequeños: agregados de plaquetas pequeños de <5 micras de altura

Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n = 5$). * $P < 0,01$ frente a la ausencia de apixaban; † $p < 0,01$ vs. apixaban 10 ng/mL; § $p < 0,05$ frente a apixaban 40 ng/mL

Efectos de apixaban en los parámetros de tromboelastometría

También se investigó cómo apixaban impactaba sobre las propiedades viscoelásticas de la formación de coágulos. Como se muestra en la **figura 2**, apixaban indujo una alteración dosis-dependiente en los parámetros medidos de tromboelastometría.

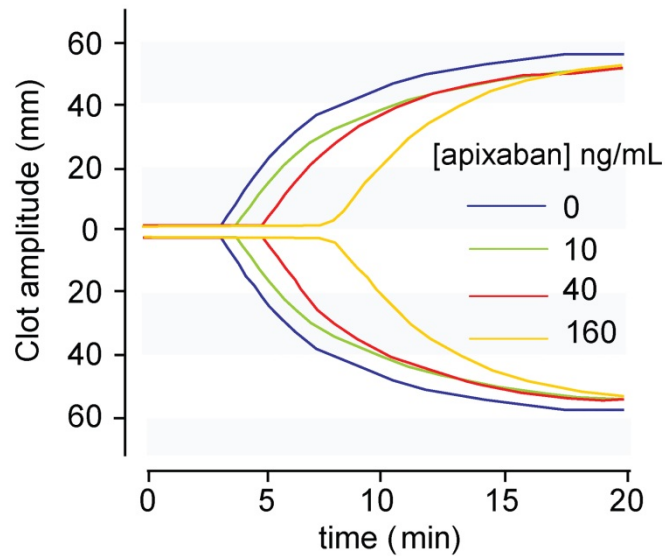


Fig. 2. Modificaciones en los perfiles de tromboelastometría de sangre total con apixaban en concentraciones bajas y altas. Los ensayos han sido activados por micelas de fosfolípidos enriquecidas en FT, y calcio. Los resultados revelan una acción dosis-dependiente de apixaban (10, 40 y 160 ng/mL) en la cinética de la formación y la firmeza del coágulo. Los tiempos de coagulación se retrasaron progresivamente con apixaban. Los efectos sobre la firmeza del coágulo fueron menos evidentes.

La exposición de sangre humana a 10, 40 o 160 ng/mL de apixaban fue seguida por un retardo progresivo en la cinética de la formación de coágulos, con prolongaciones de los parámetros relacionados con la coagulación (TC y TFC). Estas prolongaciones alcanzaron niveles de significación estadística para las concentraciones de apixaban ≥ 40 ng/mL. Se observaron tendencias similares para los TFC. La evaluación de los cambios en la firmeza del coágulo mostraron una tendencia a la reducción de la firmeza del coágulo en 10 min (A10) con concentraciones crecientes de apixaban, pero las diferencias nunca alcanzaron los niveles de significación estadística. Más información detallada se ofrece en la **tabla 2**.

Tabla 2. Modificaciones en los parámetros de tromboelastometría con apixaban desencadenados por micelas de fosfolípidos enriquecidas en FT, y calcio.

apixaban (ng/mL)	TC (min)	TFC (min)	A10 (mm)
0	211,7 ± 13,3	95,7 ± 8,8	53,2 ± 2,3
10	247,8 ± 44,3	109,6 ± 9,1	52,4 ± 2,3
40	289,2 ± 48,6 *	129,2 ± 16,4	49,0 ± 2,9
160	367,7 ± 30,6 *#	141,0 ± 9,9 *#	47,7 ± 2,4

Apixaban retrasó la cinética de formación de coágulos, medida como tiempo de coagulación (TC) y tiempo de formación de coágulo (TFC); y la reducción de la firmeza del coágulo después de 10 min (A10). Los resultados se expresan como media ± S.E.M. (n = 5-6 para apixaban 0 y 160 ng/mL). *P <0,05 vs. apixaban 0 ng/mL y #p <0,05 vs. apixaban 10 ng/mL.

Impacto de apixaban en la generación de trombina mediado por plaquetas.

La contribución de las plaquetas a la generación de trombina local fue investigada en un modelo celular modificado de generación de trombina mediado por plaquetas. Los perfiles representativos de generación de trombina se muestran en la **figura 3**. Los valores normales para la fase de latencia en los experimentos en ausencia de apixaban fueron 7,0 ± 0,8 min, con un pico máximo de trombina equivalente a 79,1 ± 4,9 nM, alcanzado al 21,8 ± 3,1 min.

Apixaban mostró una clara relación dosis-efecto en la cinética de generación de trombina, con retardos progresivos, tanto en el momento de iniciar la generación de trombina (tiempo de latencia), el cual se duplicó y se mantuvo con todas las concentraciones de apixaban analizadas (tiempos de latencia que van desde 13 min a 13,4 min), como el tiempo para alcanzar el máximo del pico de trombina, el cual se prolonga de un modo dosis-dependiente (37,1 ± 1,9 min, 57,8 ± 8,8 min y 72,5 ± 6,2 min, respectivamente, con apixaban 10, 40 y 160 ng/mL). Estas reducciones alcanzaron significación estadística con todas las concentraciones investigadas apixaban frente a los experimentos de control (p <0,01). Además, el pico máximo de trombina generada se redujo proporcionalmente a la dosis de apixaban (60,9 ± 1,0 nM, 55,7 ± 3,5 nM y 36,7 ± 3,1nM, respectivamente con apixaban 10, 40 y 160 ng/mL), alcanzando inhibiciones estadísticamente significativas con todas las concentraciones de apixaban en comparación a los estudios controles realizados en ausencia de este anticoagulante (p

<0,01). El pico de trombina y el área bajo la curva (ABC) alcanzados con 160 ng/mL de apixaban se redujeron significativamente con los resultados respectivos observados para las concentraciones de 10 o 40 ng/mL ($p < 0,01$). Los resultados se resumen en la **tabla 3**.

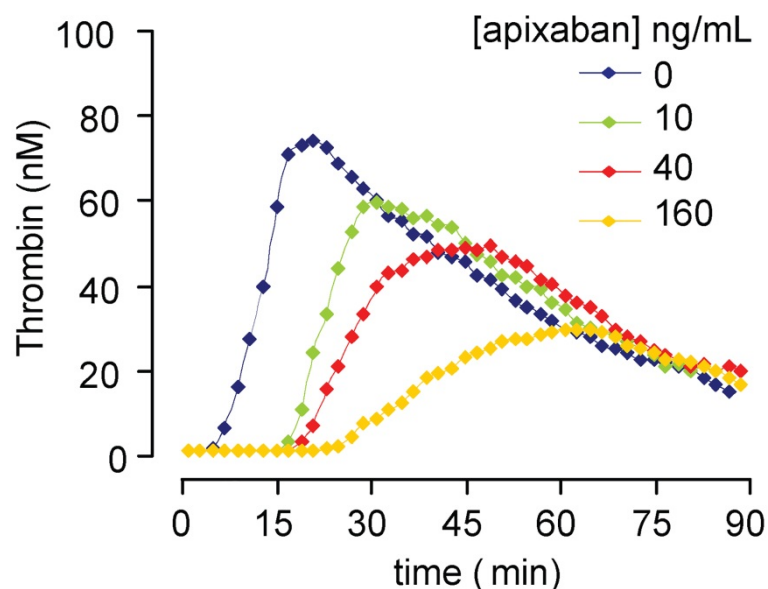


Fig. 3. Impacto de apixaban en un modelo modificado de generación de trombina mediado por plaquetas. Los perfiles de generación de trombina representativos muestran el impacto de diferentes dosis de apixaban en la contribución de las plaquetas a la generación de trombina local mediado por plaquetas, activada por micelas de fosfolípidos enriquecidas en FT, y calcio. Apixaban causó prolongaciones dosis-dependientes en la iniciación de la generación de trombina con una reducción paralela en el pico de trombina y la cantidad total de trombina generada. Este ensayo detectó alteraciones en la cinética de la generación de trombina y la cantidad total de trombina generada, incluso con las concentraciones más bajas de apixaban ensayadas (10 y 40 ng/mL).

Las determinaciones con vehículo, en lugar de plaquetas, demostraron retrasos críticos en los parámetros cinéticos de la generación de trombina, muy por encima de los ensayos en presencia de plaquetas, con cantidades mínimas de trombina generada durante el ensayo oscilando entre 0,89 a 5,45 nM. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de apixaban exploradas. Por el contrario, la presencia de plaquetas se asoció con una aceleración y potenciación de la generación de trombina. Apixaban mostró un claro efecto inhibitorio dosis-dependiente de la generación de trombina mediada por plaquetas en este escenario experimental;

incluso con la concentración más baja ensayada (10 ng/mL), aproximadamente 16 veces por debajo de la C_{max} terapéutica. Los resultados con vehículo se resumen en la **tabla S1**.

Tabla 3. Las modificaciones en los parámetros de generación de trombina inducida por concentraciones crecientes de apixaban en muestras enriquecidas con plaquetas.

[Apixaban] ng/mL	Fase de Latencia (min)	Pico Trombina		Área debajo la curva (ABC)
		Tiempo (min)	Pico (nM)	
0	7,0 ± 0,8	21,8 ± 3,1	79,1 ± 4,9	3156,8 ± 96,5
10	13,0 ± 0,5 *	37,1 ± 1,9 *	60,9 ± 1,0 *	2664,2 ± 87,2 *
40	13,4 ± 1,4 *	57,8 ± 8,8 *	55,7 ± 3,5 *	2447,3 ± 178,0 *
160	13,4 ± 0,9 *	72,5 ± 6,2 *†	36,7 ± 3,1 *†§	1421,8 ± 234,1 *†§

Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 5). * P <0,01 frente apixaban 0 ng/mL
† p <0,01 vs. apixaban 10 ng/mL; § p <0,05 frente a apixaban 40 ng/mL

Tabla S1. Parámetros de generación de trombina mediados por plaquetas *frente* al vehículo.

[Apixaban] ng/mL	plaquetas + 7,5 % PPP	vehículo + 7,5 % PPP
Fase de Latencia (min)		
0	7,0 ± 0,8	16,2 ± 2,8
10	13,3 ± 0,5 *	17,8 ± 1,7
40	13,4 ± 1,4 *	23,2 ± 2,0 #
160	13,4 ± 0,9 *	17,6 ± 2,4 #
Tiempo de Trombina (min)		
0	21,8 ± 3,1	42,4 ± 18,1
10	37,1 ± 1,9 *	44,4 ± 19,9
40	57,8 ± 8,8 *	54,4 ± 16,5
160	72,5 ± 6,2 *†	31,2 ± 13,9
Pico de Trombina (nM)		
0	79,1 ± 4,9	3,8 ± 1,0 #
10	60,9 ± 1,0 *	5,6 ± 2,5 #
40	55,7 ± 3,5 *	2,6 ± 1,0 #
160	36,7 ± 3,1 *†§	1,9 ± 0,6 #
Área Bajo la Curva (ABC)		
0	31568, ± 96,5	106,8 ± 51,4 #
10	2664,2 ± 87,2 *	103,6 ± 46,1 #
40	2447,3 ± 178,0 *	26,1 ± 11,7 #
160	1421,8 ± 234,1 *†§	3,5 ± 2,1 #

En las filas se comparan las mediciones entre las muestras con plaquetas y con vehículo para la misma concentración de apixaban. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 5).

* p<0,01 vs. el control correspondiente (plaquetas/vehículo) con apixaban a 0 ng/mL

† p<0,01 vs. apixaban 10 ng/mL

§ p<0,05 vs. apixaban 40 ng/mL

p<0,05 vs. la misma concentración de apixaban in plaquetas + 7,5 % PPP

DISCUSIÓN

La evidencia generada, tanto en seguridad y eficacia, de apixaban en su primera indicación en profilaxis y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa, en varios estudios clínicos con miles de pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor, sirvió como antesala para considerar con grandes expectativas los ensayos en una patología de elevada mortalidad como es la FA. Los resultados de dos grandes ensayos clínicos fase 3 han demostrado la eficacia y seguridad de apixaban en comparación con AAS o warfarina en la prevención del ictus en pacientes con FANV. Asimismo, apixaban demostró superioridad frente a los clásicos AVK en los resultados especificados previamente de ictus cerebral, embolia sistémica, sangrado mayor y muerte. Además, para los pacientes no aptos para el tratamiento con AVK, apixaban mostró más eficacia que la AAS en la prevención del ictus con similares niveles de seguridad con respecto a los riesgos de sangrado. La eficacia y seguridad de apixaban en los últimos ensayos clínicos fue consistente a través de varios análisis de subgrupos con insuficiencia renal, ictus previo o accidente isquémico transitorio o el riesgo de sangrado. Estos resultados tan satisfactorios hacen pensar que el espectro de pacientes con FANV que se podrían beneficiar realmente sería muy amplio, y que los pacientes de edad avanzada, con comorbilidades y poli-medicados, con mayores factores de riesgo, que se suelen encontrar en las plantas de cardiología, medicina interna o geriatría, serían sin duda candidatos para este fármaco debido a sus buenos atributos, además del resto de *pool* de pacientes con esta dramática y prevalente patología. Además, en estos pacientes el riesgo de sangrado mayor es más frecuente, con lo cual sería más óptimo el tratarlos con apixaban que con AVK, los cuales presentan un mayor riesgo de hemorragia. El riesgo de hemorragia asumido con anticoagulantes debe ser equilibrado respecto al riesgo subyacente de ictus en ausencia de tratamiento.

El desarrollo de la FA ocurre en un 2-21% de pacientes con SCASEST. La FA aumenta el riesgo de empeoramiento de la isquemia, el desarrollo de insuficiencia cardíaca y de complicaciones tromboembólicas. La FA que complica el SCA se asocia con un aumento de la mortalidad en el hospital a largo plazo (97), siendo el SCA una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario (91) (92). La activación y agregación plaquetaria sobre la superficie trombogénica expuesta de una placa rota es un evento importante precoz en la patogénesis de la SCA (101) (102). La utilización de anticoagulantes en el SCA durante la fase aguda y a largo plazo ha mejorado su

pronóstico debido a la reducción de episodios trombóticos, pero asociándose a mayor riesgo de sangrado. En los últimos años se han desarrollado los ACODs, los cuales presentan menor riesgo de sangrado. Por el momento, rivaroxaban es el único ACOD que ha presentado un perfil de riesgo-beneficio favorable en pacientes con SCA. Apixaban y rivaroxaban pertenecen al mismo grupo farmacológico, inhibidores del FXa, sin embargo no han proporcionado resultados similares en pacientes con SCA que precisan triple terapia antitrombótica. Probablemente estas diferencias pueden estar relacionadas con el diseño y dosificación de los fármacos. También la dosis de rivaroxaban utilizada es más baja que en los ensayos de prevención del ictus isquémico en FA. Consecuentemente, las dosis bajas de anticoagulación pueden ser más adecuadas para los pacientes que precisen triple terapia en el caso de los fármacos anti-FXa. Estos hallazgos apoyan el concepto de que una baja intensidad de inhibición del FXa puede ser más efectiva en la prevención secundaria de SCA (109).

Teniendo en cuenta estos resultados, fruto del objetivo principal de estudiar la acción inhibitoria diferencial de formación de trombos de apixaban en los componentes plaquetarios y de fibrina, mediante estudios con sangre circulante y un modelo generación de trombina basado en plaquetas, se ha visto que apixaban mostró acciones antitrombóticas variables en las diferentes aproximaciones experimentales investigadas. En los estudios de flujo en un modelo de trombosis de sangre circulante a índices de cizalladura arteriales, las concentraciones de apixaban equivalentes a la C_{max} obtenidas en pacientes que recibieron tratamiento para la profilaxis de complicaciones trombóticas debidas a FA, redujeron significativamente la generación de fibrina y la formación de agregados plaquetarios. Estos efectos sobre las plaquetas y la formación de fibrina no se observaron con las concentraciones más bajas de apixaban probadas. En contraste con las observaciones previas, las concentraciones de 4 a 16 veces por debajo de la C_{max} para la prevención de ictus y embolia sistémica en pacientes con FANV mostraron todavía una acción inhibitoria significativa en la contribución de las plaquetas a la generación de trombina en los estudios bajo condiciones más estáticas. Una combinación de estudios con sangre circulante y generación de trombina en un entorno rico en plaquetas podría ser útil para diferenciar concentraciones de anticoagulantes que inhiben la formación de trombina mediada por plaquetas de aquellas que

sumamente perjudican la formación de fibrina necesaria para la consolidación de la hemostasia.

Nuestros estudios actuales demuestran un impacto diferencial de concentraciones altas frente bajas de apixaban sobre los componentes de la coagulación y las plaquetas en la formación de trombos en los estudios en condiciones de flujo. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que apixaban a una concentración compatible con la C_{max} alcanzada en los pacientes sometidos a tratamiento para la profilaxis de complicaciones trombóticas (180,111,113,110), reduce drásticamente la incorporación de fibrina en la formación de trombos en un modelo de trombosis similar con sangre humana circulante a índices de cizalladura moderadas. Nuestros resultados actuales con apixaban a 160 ng/mL indican que, además de su potente acción inhibitoria sobre la formación de fibrina, apixaban interfirió con la formación de grandes agregados plaquetarios causando reducciones estadísticamente significativas en su tamaño. Curiosamente, las concentraciones más bajas de apixaban (40 o 10 ng/mL) no causaron modificaciones cuantitativas significativas en la deposición de fibrina, a pesar de ello, todavía se mostraron algunos efectos antiplaquetarios en condiciones de flujo dinámico. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el concepto de que bajas concentraciones de apixaban inhiben la generación de trombina mediadas por plaquetas, la cual podría facilitar la formación de trombos oclusivos ricos en plaquetas.

Las condiciones de flujo de la sangre desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de las complicaciones trombóticas venosas y arteriales (181). Los trombos venosos e intracardiacos se generan en entornos de relativamente bajo índice de cizalladura, los cuales favorecen la activación de los mecanismos de coagulación, generándose trombos ricos en fibrina. Por el contrario, la adhesión y agregación plaquetaria desempeñan un papel predominante en los índices de cizalladura elevadas que se producen en las regiones arteriales, las cuales resultan en trombos de rápido desarrollo que contribuyen a las complicaciones isquémicas en el SCA (172,182). Las condiciones de flujo están sometidas a variaciones extremas durante la formación de un trombo oclusivo cambiando desde índices de cizalladura extremadamente elevadas en el ápice de un trombo en crecimiento, a índices de cizalladura reducidas relacionados con la deceleración del flujo de sangre en la base del trombo, o a condiciones casi

estancas en la zona distal donde el trombo se está formando (183,41). En estas circunstancias, las plaquetas circulantes cerca de la pared del vaso interactúan con plaquetas agregadas ya depositadas en una placa aterosclerótica dañada, siendo activadas aún más por la trombina generada localmente, y favoreciendo la propagación del trombo (37). En la presente tesis doctoral hemos modificado y optimizado una técnica *in vitro* de generación de trombina para valorar la contribución de las plaquetas a la generación local de trombina en una versión modificada del modelo celular de la coagulación en presencia de un elevado número de plaquetas, FT y plasma diluido (184). Nuestros resultados en este ensayo de generación de trombina mediados por plaquetas difieren de los estudios con la sangre circulante. Mientras que la inhibición de la generación de trombina seguía una relación dosis-efecto con la concentración de apixaban en los ensayos de generación de trombina, la inhibición de la formación de fibrina y la deposición de plaquetas se observó solamente con la concentración más elevada de apixaban en estudios con la sangre circulante. Estos resultados confirman que las concentraciones de apixaban requeridas para inhibir la formación de fibrina bajo condiciones de flujo son mucho más altas que las necesarias para inhibir significativamente la generación de trombina en un ambiente rico en plaquetas.

La trombina generada localmente juega un papel crítico en la composición y estructura de los coágulos hemostáticos y oclusivos a través de la activación de las plaquetas y la generación de una red de fibrina que consolidará trombos crecientes. En coágulos hemostáticos, la fibrina estabiliza el tapón inicial rico en plaquetas para controlar el sangrado a través de un vaso lesionado (185). La formación de fibrina también contribuye a la formación de coágulos patológicos bajo índices de cizalladura arterial elevadas que conducen a un aumento de la presencia de plaquetas y a un empaquetamiento de fibrina de baja porosidad que limita la difusión de la trombina (15). En las primeras etapas de la formación de coágulos arteriales patológicos generados, la trombina se elimina rápidamente por el torrente sanguíneo dejando sólo la trombina generada en el núcleo para activar y reclutar plaquetas adicionales (186). A medida que el trombo se hace más oclusivo, la trombina generada incorpora más fibrina y plaquetas, convirtiéndose en más resistente y reduciendo su porosidad (183,41). La inhibición de la trombina generada local en el nivel de un trombo plaquetario consolidado en una placa dañada, debería impedir que la retroalimentación

de trombina generada promoviera la activación de más plaquetas circulantes y la asociación de fibrina y VWF a la formación del trombo. Nuestros datos indican que las concentraciones más bajas de apixaban probadas en nuestros estudios pueden interferir con este mecanismo de retroalimentación, y conservar aún la formación de coágulos de fibrina hemostáticos.

Los resultados aportados en esta tesis, demuestran que apixaban retrasó los parámetros cinéticos de tromboelastometría, pero pareció tener un impacto mínimo en las propiedades estructurales de los coágulos formados. La prolongación de los tiempos de coagulación con las dosis crecientes de apixaban fue en paralelo a las reducciones medidas en la cinética de generación de trombina. Por el contrario, apixaban como otros ACODs no modificó de forma significativa la firmeza del coágulo máxima de los coágulos formados en el sistema ROTEM (113,187). Nuestros estudios de tromboelastometría reflejan la acción antitrombótica de apixaban en coágulos venosos y hemostáticos como una prolongación de los tiempos de coagulación relacionados con una generación reducida y retardada de la trombina. Sin embargo, la composición de coágulos generados en condiciones de bajos índices de cizalladura producidas en tromboelastometría sería completamente diferente de los trombos oclusivos ricos en plaquetas generados en las placas ateroscleróticas rotas. Es probable que los resultados de tromboelastometría no aporten información adicional sobre la estructura y la resistencia del coágulo cuando se forman coágulos a índices de cizalladura elevados.

Adicionalmente, los resultados de nuestros estudios actuales podrían tener implicaciones clínicas. La combinación de la inhibición de formación de fibrina y la agregación plaquetaria causada por los ACODs puede interferir con la hemostasia y como resultado en un aumento del sangrado. De hecho, una mejora de la acción antitrombótica de rivaroxaban conjuntamente con un tratamiento antiplaquetario simple o dual se ha demostrado en un modelo de trombosis-stent porcino (188). Por otro lado, el ensayo APPRAISE-2 investigó el posible efecto beneficioso concomitante de apixaban y la terapia antiplaquetaria estándar en SCA; sin embargo, la dosis de 5 mg BID, equivalente a la dosis de anticoagulante completo recomendado para FANV reveló resultados insatisfactorios (107). Este ensayo clínico se terminó prematuramente debido a un aumento en los eventos de hemorragia con apixaban en ausencia de una reducción de compensación en los eventos isquémicos recurrentes. Paralelamente,

rivaroxaban fue probado en un ensayo de fase 2 de búsqueda de dosis (ATLAS ACS-TIMI 46) 5, 10 y 20 mg (QD, o BID) y frente a placebo. Se observó que a dosis más bajas (BID) se redujo, con los *hazard ratios (HR)* más bajos observados, el criterio de valoración combinado de muerte, infarto de miocardio o ictus, mientras que hubo un aumento dependiente de la dosis en los eventos de sangrado (189). Sobre la base de estas observaciones, se diseñó un ensayo de fase 3, llamado ATLAS ACS 2-TIMI 51, para evaluar rivaroxaban, a “dosis muy baja” de 2,5 mg BID y “dosis baja” 5 mg BID, junto a la doble terapia antiagregante en pacientes con SCA reciente, con el objetivo de determinar un régimen de dosis baja clínicamente efectivo. Rivaroxaban – a dosis $\frac{1}{4}$ (2,5 mg BID) y $\frac{1}{2}$ (5 mg BID) de la dosis indicada para FANV (20 mg QD) – redujo significativamente la mortalidad cardiovascular, y los eventos isquémicos (incluyendo trombosis del stent en los pacientes sometidos a angioplastia, infarto de miocardio o ictus) para una mediana de seguimiento de 1,1 años en comparación a placebo. Hubo, sin embargo, un aumento significativo de sangrados graves e intracraneales, aunque no de sangrados mortales (106). La mejor relación riesgo-beneficio fue con la dosis “muy-baja” de rivaroxaban 2,5 mg BID.

Además, existen datos recientes de un ensayo clínico, PIONEER AF-PCI (190), estudio prospectivo y aleatorizado con diversas estrategias de tratamiento anticoagulante -rivaroxaban y AVK-, y antiagregante -doble antiagregación o sólo con clopidogrel/ticagrelor/prasugrel- para investigar la estrategia de tratamiento más segura para pacientes con FANV que han recibido una derivación (stent) durante una intervención coronaria percutánea (ICP). Se aleatorizaron 2.100 pacientes en 3 brazos de tratamiento: Grupo 1: rivaroxaban (15 mg QD) con clopidogrel (75 mg QD [o ticagrelor 90 mg BID o prasugrel 10 mg QD en $\leq 15\%$ de los pacientes]); Grupo 2: rivaroxaban (2,5 mg BID) con baja dosis de AAS (75-100 mg) y con clopidogrel (ídem Grupo 1); y Grupo 3: AVK con AAS y clopidogrel (ídem Grupo 1). La duración de la doble y triple antiagregación fue establecida por los clínicos según los casos (de 1, 6 o 12 meses), y el seguimiento fue de al menos 12 meses. Las pautas de tratamiento fueron seleccionadas en base a estudios previos, como el WOEST (AVK y clopidogrel), ATLAS ACS 2 TIMI 51 (rivaroxaban en SCA con dosis de 2,5 o 5 mg BID) y ROCKET AF (15 mg QD en el 30% de los pacientes con deterioro de la función renal y utilizado en la vida real en alrededor del 30-40% de los casos). Las tasas de sangrado clínicamente significativo

fueron menores en los dos grupos tratados con rivaroxaban que en el grupo que recibía la terapia estándar con AVK (16,8% en grupo 1, 18,0% en grupo 2, y 26,7% en grupo 3; hazard ratio (HR) para grupo 1 vs. grupo 3, 0,59; 95% IC, 0,47-0,76; $P < 0,001$; HR para grupo 2 vs. grupo 3, 0,63; 95% IC, 0,50-0,80; $P < 0,001$). Las tasas de muerte por causa cardiovascular, infarto de miocardio o ictus fueron similares en los tres grupos (6,5% en grupo 1, 5,6% en grupo 2, y 6,0% en grupo 3; P NS para todos). También se observó una reducción de los ingresos por complicaciones cardiovasculares o sangrado en las estrategias de tratamiento con rivaroxaban. En conclusión, en pacientes con FA en los que se coloca un stent coronario, la administración de la “dosis baja” de rivaroxaban 15 mg QD más inhibidor de P2Y₁₂ durante 12 meses o la “dosis muy baja” de rivaroxaban 2,5 mg BID más doble antiagregación durante 1, 6 o 12 meses se asoció con menores tasas de sangrado clínicamente significativo que la terapia estándar con AVK y DAPT durante 1, 6 o 12 meses. El estudio no tiene potencia para analizar la eficacia de las distintas estrategias de tratamiento en la reducción de los eventos tromboembólicos, aunque en los datos observados los tres grupos fueron similares en este sentido; no obstante, los amplios intervalos de confianza no permiten extraer conclusiones concluyentes sobre la eficacia. Así, este estudio debe aumentar nuestra confianza en la selección de la estrategia más segura para el tratamiento de estos enfermos con FA y stent coronario, pero los intervalos de confianza no permiten saber si las distintas estrategias presentan diferencias en la eficacia (190).

Además, en el mismo contexto que el estudio PIONEER AF-PCI, con pacientes con FANV e ICP, están en marcha los ensayos clínicos RE-DUAL PCI (dabigatran), AUGUSTUS (apixaban), y ENTRUST-AF-PCI (edoxaban). Ninguno de estos estudios podría tener el tamaño muestral suficiente para proporcionar evidencia definitiva sobre la eficacia. Sin embargo, si no hubiera heterogeneidad sustancial, tal vez la puesta en común de los datos (*pooling data*) podría proporcionar mayor claridad sobre el cóctel antitrombótico óptimo. Por el momento, en los pacientes que no están en ensayos clínicos, la terapia oral triple plena con agentes antiplaquetarios duales y la anticoagulación con dosis completa debe evitarse como práctica rutinaria (191).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios ATLAS ACS 2-TIMI 51 y PIONEER AF-PCI, a “dosis muy baja” de rivaroxaban 2,5 mg BID se confirma la eficacia y seguridad, concomitante con doble terapia antiagregante, en pacientes con

FA que padecen enfermedad coronaria, y además, se asocia con una reducción del riesgo de mortalidad por toda causa o hospitalización recurrente por efectos adversos comparado con el tratamiento estándar con AVK y doble antiagregación (192).

Actualmente, se está llevando a cabo otro ensayo clínico fase III, COMPASS, con más de 25.000 pacientes con enfermedad arterial periférica (EAP) o coronaria (EAC), donde el objetivo primario es la prevención de eventos adversos cardíacos mayores (MACE) entre los que figura la muerte cardiovascular, el infarto de miocardio y el ictus, donde se está examinando el rol de las "dosis muy baja" de rivaroxaban 2,5 mg BID combinada con monoterapia antiagregante (AAS 100 mg QD), además de los otros 2 brazos: rivaroxaban 5 mg BID o AAS 100 mg QD. Sus conclusiones podrían ayudar a elucidar dicho rol en el espectro de la aterotrombosis (191). De hecho, recientemente, el pasado 8 de Febrero 2017, se ha publicado en prensa médica especializada que este estudio se ha suspendido precozmente, más de un año antes (su finalización estaba planificada en Marzo 2018), por un exceso de beneficio y seguridad de rivaroxaban frente a AAS. Esta decisión ha sido basada en la recomendación del *Comité independiente de Seguimiento de Datos (DMC)* del estudio, debido a que en el análisis intermedio planificado, el endpoint MACE alcanzó la superioridad con rivaroxaban. A pesar de ello, ahora falta que se conozcan estos resultados para saber exactamente cómo fue este beneficio, los cuales se esperan que se presenten a finales de 2017. Bayer y su socio en este proyecto, Janssen, no han desvelado aún qué régimen de rivaroxaban (2,5 mg BID+AAS ó 5 mg BID) fue superior para el endpoint primario. En la comunidad médica se ha comentado que sólo "al menos uno de los brazos de rivaroxaban fue superior a AAS sola". Mientras que AAS, hoy por hoy, se considera un pilar para los pacientes de alto riesgo con EAP/EAC documentada, un cambio o la adición de un ACOD representarían un cambio importante en la práctica clínica (193,194).

Es muy posible que la selección de dosis de apixaban para la prevención de complicaciones tromboticas en los territorios arteriales se basara en las establecidas para otras indicaciones antitromboticas, y no tuvo en cuenta la acción anti-hemostática de las dosis elevadas de apixaban a índices de cizalladura elevados. Nuestros datos indican que las concentraciones más bajas de apixaban, que a las que están indicadas para la prevención y tratamiento de complicaciones tromboembólicas, pueden interferir

con la generación de trombina en un entorno rico en plaquetas, pero aun así, preservan la contribución de fibrina para la salvaguardia de su función hemostática. ¿Sería posible que apixaban, a dosis bajas, se podría comportar como un tratamiento antiplaquetario *per se*?

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo experimental de esta tesis permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Apixaban mostró una acción inhibitoria diferencial sobre los componentes de hemostasia primaria y secundaria dependiendo de las técnicas utilizadas para su estudio.
2. Los efectos de concentraciones crecientes (10, 40 y 160 ng/mL) de apixaban inhibieron distintamente la generación de trombina local, los parámetros tromboelastométricos durante la formación del coágulo, y la deposición de plaquetas y fibrina en los vasos dañados en los estudios con la sangre circulante.
3. En los estudios en condiciones de flujo, apixaban muestra una acción antiplaquetaria notable con las concentraciones más altas (40 y 160 ng/mL).
4. La concentración más elevada de apixaban inhibe casi completamente la formación de fibrina en los estudios en condiciones de flujo arterial.
5. Concentraciones de apixaban 4 a 16 veces inferiores a la C_{max} , alcanzada con la dosis antitrombótica aprobada para FANV, podrían ser adecuadas para reducir la generación de trombina, la formación de agregados de plaquetas grandes y, aun así, permitir la formación de fibrina, preservando así su contribución a la hemostasia en el contexto del SCA.
6. Los estudios en los ensayos modificados de generación de trombina mediados por plaquetas podrían ser útiles para investigar la acción antiplaquetaria de otros ACODs en la prevención de complicaciones aterotrombóticas en territorios arteriales.
7. Nuestros resultados indican que los estudios experimentales en condiciones de flujo *en combinación* con los ensayos de la generación de trombina modificados podrían facilitar la selección de la concentración de ACOD, la cual prevendría el

reclutamiento de plaquetas relacionadas con la trombina en los trombos patológicos arteriales, reduciendo el riesgo de interferir con la formación de fibrina necesario para la consolidación de la hemostasia.

Estos datos deben permitir el desarrollo de estudios posteriores en los que se pueda establecer el efecto antitrombótico de las asociaciones de apixaban a bajas dosis, que a las que están indicadas para la prevención y tratamiento de complicaciones tromboembólicas, con los agentes antiplaquetarios utilizados en la prevención secundaria de eventos aterotrombóticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Furie B, Furie B. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;; p. 359:938-949.
2. Furie B, Furie B. Molecular basis of blood coagulation. In *Hematology. Basic principles and practice*. 5th ed. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, USA: Hoffman R et al (eds) ; 2009. p. 1819-1836.
3. Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*. 1964;; p. 202:498-499.
4. Davie E, Ratnoff O. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;; p. 145:1310-1312.
5. Hoffman M, Monroe D. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;; p. 85:958-965.
6. Hoffman M, Monroe D. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep*. 2005;; p. 4:391-396.
7. Furie B, Furie. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005;; p. 115:3355-62.
8. Rao L, Pendurthi U. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;; p. 25:47-56.
9. Monroe D, Key N. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost*. 2007;; p. 5:1097-105.
10. Hirsh J. New anticoagulants. *Am Heart J*. 2001;; p. 142: S3-S8.
11. Bauer K. New Anticoagulants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;; p. 450-6.
12. Escolar, G , García Frade J, Lopez Fernandez, MF , Roldán, V , et al.. Guía SEHH-SETH para el manejo de los nuevos anticoagulantes orales 2015. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) Web Nacional Oficial. [Online].; 2015 [cited 2017 Abril 08. Available from: HYPERLINK "http://www.sehh.es/es/documentos/guias-y-documentos/1747-guia-sehh-seth-para-el-manejo-de-los-nuevos-anticoagulantes-orales.html"
<http://www.sehh.es/es/documentos/guias-y-documentos/1747-guia-sehh-seth-para-el-manejo-de-los-nuevos-anticoagulantes-orales.html> .
13. Connolly S, Eikelboom J, Joyner C, et al.. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;; p. 364(9):806-17.
14. Granger C, Alexander J, McMurray J, et al.. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;; p. 365: 981-992.
15. Muthard R, Welsh JD, Brass LF, Diamond SL. Fibrin, gamma'-fibrinogen, and transclot pressure gradient control hemostatic clot growth during human blood flow over a

- collagen/tissue factor wound. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(645-654).
16. Tschopp T, Weiss H, Baumgartner H. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med.* 1974;; p. 83:296-300.
 17. Escolar G, White J. Changes in glycoprotein expression after platelet activation:differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost.* 2000;; p. 83:371-86.
 18. Harrison P, Cramer E. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;; p. 7:52-62.
 19. White J. Platelet structural physiology: the ultrastructure of adhesion, secretion, and aggregation in arterial thrombosis. *Cardiovasc Clin.* 1987;; p. 18:13-33.
 20. White J. Ultrastructural modifications in platelet membranes and cytoskeleton following activation. *Blood Cells.* 1983;; p. 9:237-61.
 21. Arita H, Nakano T, Hanasaki K. Thromboxane A2: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res.* 1989;; p. 28:273-301.
 22. Rendu F, Lavie P, Saleun S, et al.. Platelet procoagulant activity is independent of aggregation. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1995;; p. 37:327-31.
 23. Escolar G, Diaz-Ricart M, Gomez-Gil E, et al.. Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. *Drugs Today (Barc).* 2005;; p. 41:721-43.
 24. Brummel K, Paradis S, Butenas S, Mann K. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood.* 2002;; p. 100:148-152.
 25. Douglas A. *Biochemistry of blood coagulation.Hemostasis. A case oriented approach* Igaku-Shoin, New York - Tokyo; 1985.
 26. Waugh A, Grant A. *Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness.* 11th ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2011.
 27. Riddel JJ, Aouizerat B, Miaskowski C, et al.. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007;; p. 24:123-31.
 28. Weiss H, Turitto V, Baumgartner H, Nemerson Y. Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood.* 1989;; p. 73:968-975.
 29. Hoffbrand A, Moss P, Pettit J. *Platelets, blood coagulation and haemostasis.* In.: Blackwell Publishing, Inc.; 2009. p. 267-77.
 30. Cesarman-Maus G, Hajjar K. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;; p. 129:307-21.

31. Monroe, DM , Hoffman, M , Rob, HR. Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Sep; 1;22(9)(1381-9).
32. Gomez K, McVey J. Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci.* 2006; 11: p. 1349-59.
33. Monroe D, Roberts H, Hoffman M. Transmission of a procoagulant signal from tissue-bearing cells to platelets. *Br J Haematol.* 1994;(88:364-371).
34. Crawley J, Zanardelli S, Chion C, et al. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 Suppl 1:95-101.
35. Aarts P, van den Broek B, Prins G, Kuiken G, Sixma J, Heethaar R. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis.* 1988; 8:819-824.
36. Aarts P, Heethaar R, Sixma J. Red blood cell deformability influences platelets-vessel wall interaction in flowing blood. *Blood.* 1984; 64:1228-1233.
37. Turitto V, Hall C. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Res.* 1998; 92:S25-S31.
38. Hyun S, Kleinstreuer C, Archie JJ. Hemodynamics analyses of arterial expansions with implications to thrombosis and restenosis. *Med Eng Phys.* 2000; 22:13-27.
39. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.* 2006; 259:381-392.
40. Baumgartner H. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res.* 1973; 5:167-179.
41. Nesbitt W, Mangin P, Salem H, Jackson S. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med.* 2006; 84:989-995.
42. Go A, Hylek E, Phillips K, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors In Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 2001; 285(18):2370-2375.
43. Smith J, Platonov P, Hedblad B, Engström G, Melander O. Atrial fibrillation in the Malmö Diet and Cancer study: a study of occurrence, risk factors and diagnostic validity. *Eur J Epidemiol.* 2010; 25(2):95-102.
44. Fuster V, Rydén L, Cannom D, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the ESC Committee. *Circulation.* 2006; 114:e257–e354.

45. Lloyd-Jones D, Wang T, Leip E, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation. *Circulation*. 2004; 110(9):1042-1046.
46. Heeringa J, van der Kuip D, Hofman A, Kors J, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J*. 2006; 27(8):949-53.
47. DeWilde S, Carey I, Emmas C, Richards N, Cook D. Trends in the prevalence of diagnosed atrial fibrillation, its treatment with anticoagulation and predictors of such treatment in UK primary care. *Heart*. 2006; 92(8):1064-70.
48. Lloyd-Jones D, Adams R, Brown T, et al. Executive summary. Heart disease and stroke statistics 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121(7):e46-e215.
49. Wolf P, Abbott R, Kannel W. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The Framingham Study. *Stroke*. 1991; 22(8):983-988.
50. Penado S, Cano M, Acha O, Hernández J, Riancho J. A. Atrial fibrillation as a risk factor for stroke recurrence. *Am J Med*. 2003; 114(3):206-10.
51. Carter A, Catto A, Mansfield M, Bamford J, Grant P. Predictive variables for mortality after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2007; 38(6):1873-80.
52. Hannon N, Sheehan O, Kelly L, Marnane M, Merwick A, et al. Stroke associated with atrial fibrillation-incidence and early outcomes in the north Dublin population stroke study. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29(1):43-9.
53. Ringborg A, Nieuwlaat R, Lindgren P, et al. Costs of atrial fibrillation in five European countries: results from the Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Europace*. 2008; 10(4):403-11.
54. Camm A, Kirchhof P, Lip G, et al. Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2010; 31(19):2369-429.
55. Crandall M, Bradley D, Packer D, Asirvatham S. Contemporary management of atrial fibrillation: update on anticoagulation and invasive management strategies. *Mayo Clin Proc*. 2009; 84:643-662.
56. Rho R, Page R. Asymptomatic atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005; 48(2):79-87.
57. Savelieva I, Camm A. Clinical relevance of silent atrial fibrillation: prevalence, prognosis, quality of life, and management. *J Interv Cardiac Electrophys*. 2000; 4:369-382.
58. Padanilam B, Prystowsky E. Atrial fibrillation: goals of therapy and management strategies to achieve the goals. *Med Clin North Am*. 2008; 92:217-235.

59. Khairy P, Nattel S. New insights into the mechanisms and management of atrial fibrillation. *CMAJ*. 2002; 167(9):1012-1020.
60. Menke J, Lüthje L, Kastrup A, Larsen J. Thromboembolism in atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2010; 105(4):502-510.
61. Watson T, Shantsila E, Lip G. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*. 2009; 373(9658):155-166.
62. Lip G, Lim H. Atrial fibrillation and stroke prevention. *Lancet Neurol*. 2007; 6(11):981-993.
63. Ito T, Suwa M, Nakamura T, Miyazaki S, Kobashi A. Quantification of left atrial appendage spontaneous echo contrast in patients with chronic nonvalvular atrial fibrillation. *J Cardio*. 2001; 37(6):325-333.
64. You J, Singer D, Howard P, Lane D, Eckman M, Fang M, et al. Antithrombotic Therapy for Atrial Fibrillation: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012; 141(2 Suppl):e531S-75S.
65. Fuster V, Rydén L, Cannom D, Crijns H, Curtis A, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates - 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines ESC-EHRA/HRS. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57:e101-98.
66. Pisters R, Lane D, Nieuwlaat R, de Vos C, Crijns H, Lip G. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*. 2010; 138:1093-100.
67. Vanhoutte P, Boulanger C. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res*. 1995 Jun;18(2):87-98).
68. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;(37(7):1923-32. Epub 2006 Jun 1).
69. Corti R, Hutter R, Badimon J, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2004;: p. 17:35-44.
70. McEver R, Moore K, Cummings R. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 1995; 270:11025-11028.
71. Schmidt A, Yan S, Wautier J, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circulation research*. 1999; 84(5):489-97.
72. Puranik R, Celermajer D. Smoking and endothelial function. *Progress in cardiovascular*

- diseases. 2003; 45(6):443-58.
73. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*. 1997; 350(9075):430-6.
74. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101(8):841-3.
75. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104(3):365-72.
76. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England Journal of medicine*. 1999; 340(2):115-26.
77. Luscher T, Tanner F, Noll G. Lipids and endothelial function: effects of lipidlowering and other therapeutic interventions. *Current opinion in lipidology*. 1996; 7(4):234-40.
78. Davies M. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996; 94(8):2013-20.
79. Cheng G, Loree H, Kamm R, Fishbein M, Lee R. Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation. *Circulation*. 1993; 87(4):1179-87.
80. Factor S, Cho S. Smooth muscle contraction bands in the media of coronary arteries: a postmortem marker of antemortem coronary spasm? *Journal of the American College of Cardiology*. 1985; 6(6):1329-37.
81. Servoss S, Januzzi J, Muller J. Triggers of acute coronary syndromes. *Progress in cardiovascular diseases*. 2002; 44(5):369-80.
82. van der Wal A, Becker A, van der Loos C, Das P. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994; 89(1):36-44.
83. Fernandez-Ortiz A, Badimon J, Falk E, Fuster V, et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994; 23(7)(1562-9).
84. Moreno P, Bernardi V, Lopez-Cuellar J, Murcia A, et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation*. 1996; 94(12):3.
85. Stary H. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992; 421:277-290.

86. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994; 90:2126-2146.
87. Moreno P, Falk E, Palacios I, Newell J, Fuster V, Fallon J. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994; 90:775-778.
88. Davies M. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000; 83(3):361-6.
89. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 2001; 104(4):503-16.
90. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420(6917):868-74.
91. Degano I, Elosua R, Marrugat J. Epidemiology of acute coronary syndromes in Spain: estimation of the number of cases and trends from 2005 to 2049. *Revista Española de Cardiología*. 2013; 66(6):472-81.
92. Bertomeu V, Cequier A, Bernal J, Alfonso F. Inhospital Mortality Due to Acute Myocardial Infarction. Relevance of Type of Hospital and Care Provided. RECALCAR Study. *Revista Española de Cardiología*. 2013; 66(12):935-42.
93. Hamm C, Bassand J, Agewall S, Bax J, Boersma E, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of ACS in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the ESC. *European heart journal*. 2011; 32(23):2999-3054.
94. O'Gara P, Kushner F, Ascheim D, Casey DJ. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013; 127(4):e362-425.
95. Ferreira-Gonzalez I, Permanyer-Miralda G, Marrugat J, et al. MASCARA (Manejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) study. General findings. *Revista Española de Cardiología*. 2008; 61(8):803-16.
96. Barrabes J, Bardaji A, Jimenez-Candil J. Prognosis and Management of Acute Coronary Syndrome in Spain in 2012: The DIOCLES Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015; 68(2):98-106.
97. Roffi M, Patrono C, Collet JP J, Mueller C, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Task Force for the Management of ACS in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the ESC. *Eur Heart J*. 2016 Jan; 37(3):267-315.
98. Botnar R. Coronary plaque characterization by T(1)-weighted cardiac magnetic resonance. *JACC Cardiovascular imaging*. 2009; 2(6):729-30.

99. Arbab-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute coronary events. *Circulation*. 2012; 125(9):1147-56.
100. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013; 368:2004–2013.
101. Badimon L, Padro T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2012; 1:60–74.
102. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007; 357:2482–2494.
103. Farb A, Burke A, Tang A, Liang T, Mannan P, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. 1996; 93(7):1354-63.
104. Burke A, Farb A, Malcom G, Liang Y, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336(18):1276-82.
105. Komócsi A, Vorobcsuk A, Kehl D, Aradi D. Use of new-generation oral anticoagulant agents in patients receiving antiplatelet therapy after an acute coronary syndrome: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2012 Nov 12; 172(20):1537-45.
106. Mega J, Braunwald E, Wiviott S, et al; ATLAS ACS 2–TIMI 51 Investigators. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012; 366:9-19.
107. Alexander J, Lopes R, James S, Kilaru R, He Y, Mohan P, et al. APPRAISE-2 Investigators. Apixaban with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2011; 365:699-708.
108. Oldgren J, Budaj A, Granger C, et al. RE-DEEM Investigators. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J*. 2011;; p. 32(22):2781-2789.
109. Goto S, Tomita A. New antithrombotics for secondary prevention of acute coronary syndrome. *Clin Cardiol*. 2014; 37;3:178-187.
110. Frost C, Wang J, Nepal S, et al. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single-dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75(2)(476-87).
111. Frost CE, Nepal S, Wang J, al e. Apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor: multiple-dose safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76(5)(776-86).

112. Diaz-Ricart M, Estebanell E, Cases A, Lopez-Pedret J, Castillo R, Ordinas A, et al. Erythropoietin improves signaling through tyrosine phosphorylation in platelets from uremic patients. *Thromb Haemost.* 1999; 82(1312-1317).
113. Escolar G, Fernandez-Gallego V, Arellano-Rodrigo E, Roquer J, Reverter JC, Sanz V, et al. Reversal of apixaban induced alterations in hemostasis by different coagulation factor concentrates: significance of studies in vitro with circulating human blood. *PLoS One.* 2013; 8(11)(e78696).
114. Galan A, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, Navalon F, Gomez E, Gasto C, et al. Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 2009; p. 102: 511-9.
115. Caballo C, Escolar G, Diaz-Ricart M, Lopez-Vilchez I, Lozano M, Cid J, et al. Impact of experimental haemodilution on platelet function, thrombin generation and clot firmness: effects of different coagulation factor concentrates. *Blood Transfus.* 2013; 11(391-399).
116. Lip G, Brechin C, Lane D. The global burden of atrial fibrillation and stroke: a systematic review of the epidemiology of atrial fibrillation in regions outside North America and Europe. *Chest.* 2012; 142: 1489-1498.
117. Alberts M, Eikelboom J, Hankey G. Antithrombotic therapy for stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation. *Lancet Neurol.* 2012; 11: 1066-1081.
118. Menke J, Luthje L, Kastrup A, Larsen J. Thromboembolism in atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2010; 105: 502-510.
119. Nörstrom E, Escolar G. Natural anticoagulants and thrombophilia. In Porwit A, McCullough J, Erber W. *Blood and Bone Marrow pathology.*: Elsevier limited. 2nd edition; 2011. p. 569-581.
120. Roberts H, Hoffman M, Monroe D. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32 Suppl 1(32-38.).
121. Ben-Hadj-Khalifa S, Hezard N, Almawi W, et al. Differential coagulation inhibitory effect of fondaparinux, enoxaparin and unfractionated heparin in cell models of thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011; 22(369-373).
122. Weitz J, Hirsh J, Samama M. New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004; 126(265S-286S).
123. Weitz J, Bates S. New anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(1843-1853).
124. Pinto D, Orwat M, Koch S, et al. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide(apixaban,BMS-562247),a highly potent, selective, efficacious, and orally

- bioavailable inhibitor of blood coagulation FXa. *J Med Chem.* 2007; 50(5339-5356).
125. Bates S, Weitz J. Apixaban. *Drugs Today (Barc).* 2008; 33(293-301).
126. Wong P, Pinto D, Zhang D. Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis.* 2011; 31(478-492).
127. He K, Luetzgen J, Zhang D, et al. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2011; 36(129-139).
128. Luetzgen J, Wang Z, Seiffert D, Rendina A, et al. Inhibition of measured thrombin generation in human plasma by apixaban: a predictive mathematical model based on experimentally determined rate constants. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: P-T-633-.
129. Wong P, Crain E, Watson C, Xin B. Favorable therapeutic index of the direct factor Xa inhibitors, apixaban and rivaroxaban, compared with the thrombin inhibitor dabigatran in rabbits. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(1313-1320).
130. Jiang X, Crain E, Luetzgen J, Schumacher W, Wong P. Apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor, inhibits human clot-bound factor Xa activity in vitro. *Thromb Haemost.* ; 101(780-782).
131. Wong P, Jiang X. Apixaban, a direct factor Xa inhibitor, inhibits tissue-factor induced human platelet aggregation in vitro: comparison with direct inhibitors of factor VIIa, XIa and thrombin. *Thromb Haemost.* 2010; 104:(302-310).
132. Samama M, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(761-772).
133. Becker R, Yang H, Barrett Y, et al. Chromogenic laboratory assays to measure the factor Xa-inhibiting properties of apixaban--an oral, direct and selective factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis.* 2011; 32(183-187).
134. Escolar G, Arellano-Rodrigo E, Reverter J, et al. Coagulation Factor Concentrates Restore Alterations in Hemostasis Induced by a High Dose of Apixaban: Studies in Vitro with Circulating Human Blood. In 54Th Annu Meet Am Soc Hematol (Ded 8-11); 2013; Atlanta. p. Abst 2263.
135. Wang L, Raghavan N, He K, et al. Sulfation of o-demethyl apixaban: enzyme identification and species comparison. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(802-808).
136. Raghavan N, Frost CE, Yu Z, et al. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(74-81).
137. Prom R, Spinler SA. The role of apixaban for venous and arterial thromboembolic disease.

- Ann Pharmacother. 2011; 45(1262-1283).
138. ELIQUIS prescribing information USA. [Online]. [cited Dec 2012. Available from: HYPERLINK "%20http://packageinserts.bms.com/pi/pi_eliquis.pdf%20%20"
http://packageinserts.bms.com/pi/pi_eliquis.pdf .
 139. Flaker GC, Hohnloser S, Wojdyla D, et al. Apixaban is efficacious and safe in patients with atrial fibrillation using concomitant amiodarone: an analysis from the aristotle trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;(61: E317).
 140. Leil TA, Feng Y, Zhang L, Paccaly A, Mohan P, Pfister M. Quantification of apixaban's therapeutic utility in prevention of venous thromboembolism: selection of phase III trial dose. *Clin Pharmacol Ther*. 2010; 88(375-382).
 141. Lassen MR, Raskob GE, Gallus A, Pineo G, Chen D, Portman RJ. Apixaban or enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement. *N Engl J Med*. 2009; 361(594-604).
 142. Lassen MR, Raskob GE, Gallus A, Pineo G, Chen D, Hornick P. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 2010; 375(9717)(807-815).
 143. Lassen MR, Gallus A, Raskob GE, Pineo G, Chen D, Ramirez LM. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement. *N Engl J Med*. 2010; 363(2487-2498).
 144. Lassen MR. Practical use of apixaban in the prevention of venous thromboembolism after total knee or hip replacement. *Drugs Today (Barc)*. 2012; 48(249-258).
 145. Eikelboom JW, O'Donnell M, Yusuf S, et al. Rationale and design of AVERROES: apixaban versus acetylsalicylic acid to prevent stroke in atrial fibrillation patients who have failed or are unsuitable for vitamin K antagonist treatment. *Am Heart J*. 2010; 159(348-353).
 146. Lopes RD, Alexander JH, Al-Khatib SM. Apixaban for reduction in stroke and other Thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) trial: design and rationale. *Am Heart J*. 2010; 159(331-339).
 147. Cowper PA, Pan W, Anstrom K, et al. Apixaban reduces hospitalization in patients with atrial fibrillation: an analysis of the effect of apixaban therapy on resource use in the apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation trial. In 62nd Annu Sci Sess Am Coll Cardiol (ACC); 2013; San Francisco. p. Abst 1245-108.
 148. Squibb BM. Bristol-Myers Squibb and Pfizer announce U.S. FDA approval of ELIQUIS(R) (apixaban) [news release]. December 28, 2012. Accessed July 23, 2013.
 149. Squibb BM. ELIQUIS(R) (apixaban) approved in Europe for prevention of stroke and systemic embolism in patients with nonvalvular atrial fibrillation [news release]. November 20, 2012. Accessed July 23, 2013.

150. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007; 298(2038-2047).
151. Soliman EZ, Prineas RJ, Go AS, et al. Chronic kidney disease and prevalent atrial fibrillation: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC). *Am Heart J*. 2010; 159(1102-1107).
152. Alonso A, Lopez FL, Matsushita K, et al. Chronic kidney disease is associated with the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 2011; 123(2946-2953).
153. Piccini JP, Hernandez AF, Zhao X, et al. Quality of care for atrial fibrillation among patients hospitalized for heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(1280-1289).
154. Marinigh R, Lane DA, Lip GY. Severe renal impairment and stroke prevention in atrial fibrillation: implications for thromboprophylaxis and bleeding risk. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57(1339-1348).
155. Eikelboom JW, Connolly SJ, Gao P, et al. Stroke risk and efficacy of apixaban in atrial fibrillation patients with moderate chronic kidney disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2012; 21(429-435).
156. Hohnloser SH, Hijazi Z, Thomas L, et al. Efficacy of apixaban when compared with warfarin in relation to renal function in patients with atrial fibrillation: insights from the ARISTOTLE trial. *Eur Heart J*. 2012; 33(2821-2830).
157. Diener HC, Eikelboom J, Connolly SJ, et al. Apixaban versus aspirin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a predefined subgroup analysis from AVERROES, a randomised trial. *Lancet Neurol*. 2012; 11(225-231).
158. Easton JD, Lopes RD, Bahit MC, et al. Apixaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of the ARISTOTLE trial. *Lancet Neurol*. 2012; 11(503-511).
159. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation--developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Europace*. 2012; 14(1385-1413).
160. Lip GY, Frison L, Halperin JL, Lane DA. Comparative validation of a novel risk score for predicting bleeding risk in anticoagulated patients with atrial fibrillation: the HAS-BLED (Hypertension, Abnormal Renal/Liver Function, Stroke, Bleeding History or Predisposition, Labile INR, etc) score. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57(173-180).
161. Flaker GC, Eikelboom JW, Shestakovska O, et al. Bleeding during treatment with aspirin versus apixaban in patients with atrial fibrillation unsuitable for warfarin: the apixaban versus ASA to prevent stroke in AF patients who have failed or are unsuitable for VKA

- treatment (AVERROES) trial. *Stroke*. 2012; 43(3291-3297).
162. Lip GY, Connolly S, Yusuf S, et al. Modification of Outcomes With Aspirin or Apixaban in Relation to CHADS2 and CHA2DS2-VASc Scores in Patients With Atrial Fibrillation: A Secondary Analysis of the AVERROES Study. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013; 6(31-38).
163. Lopes RD, Al-Khatib SM, Wallentin L, et al. Efficacy and safety of apixaban compared with warfarin according to patient risk of stroke and of bleeding in atrial fibrillation: a secondary analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2012; 380(1749-1758).
164. Agnelli G, Butler HR, Cohen A, et al. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013; 369(9)(799-808).
165. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, et al. Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013; 368(8)(699-708).
166. Lopez-Vilchez I, Escolar G, Diaz-Ricart M, Fuste B, Galan A, White J. Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa. *Thromb Haemost*. 2007 Feb; 97(2)(202-11).
167. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Eng J Med*. 1992; 326(242-250).
168. Lopez-Vilchez I, Tonda R, Hernandez RM, Navalon , Diaz-Ricart M, Galan AM, et al. Relative contributions of collagen and tissue factor to thrombus formation on damaged vascular vessels: in-vitro studies with circulating blood. *Coron Artery Dis*. 2009; 20(392-399).
169. Stalker TJ, Welsh JD, Tomaiuolo M, Wu J, Colace TV, Diamond SL, et al. A systems approach to hemostasis: 3. Thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity. *Blood*. 2014; 124(1824-1831).
170. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation factor-IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles - a flow cytometric study. *Thromb Haemost*. 1992; 68(74-78).
171. Turpie AG, Chin BS, Lip GY. Venous thromboembolism: pathophysiology, clinical features, and prevention. *BMJ*. 2002; 325(887-890).
172. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46(937-954).
173. Goldsmith HL, Bell DN, Spain S, Mcintosh FA. Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood. *Biorheology*. 1999; 36(461-468).
174. Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International

- Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1986; 55(415-435).
175. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014; 276(618-632).
176. Lowe GD. Rheological influences on thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999; 12(435-449).
177. Lowe GD, Rumley A, Whincup PH, Danesh J. Hemostatic and rheological variables and risk of cardiovascular disease. *Semin Vasc Med.* 2002; 2(429-439).
178. Tomaiuolo M, Stalker TJ, Welsh JD, Diamond SL, Sinno T, Brass LF. A systems approach to hemostasis: 2. Computational analysis of molecular transport in the thrombus microenvironment. *Blood.* 2014; 124(1816-1823).
179. Carreras ET, Mega JL. Role of oral anticoagulants in patients after an acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(520-524).
180. Bristol-Myers Squibb. ELIQUIS (apixaban) - Product Monograph.. [Online].; 16 Jun 2016: page 32.. Available from: HYPERLINK "http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10028126/f/201607/ELIQUIS_PM_184464_16June2016_E_marketed.pdf%20"
http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10028126/f/201607/ELIQUIS_PM_184464_16June2016_E_marketed.pdf.
181. Turpie AGG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis – pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2011; 105(586-596).
182. Turpie AGG, Fisher WD, Baue KA, Kwong LM, Irwin M, Kälebo P, et al. BAY 59-7939: an oral, direct Factor Xa inhibitor for the prevention of venous thromboembolism in patients after total knee replacement. A phase II dose-ranging study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(2479-2486).
183. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009; 7 Suppl 1(17-20).
184. Hoffman M, Volovyk Z, Monroe D. Reversal of dabigatran effects in models of thrombin generation and hemostasis by factor VIIa and prothrombin complex concentrate. *Anesthesiology.* 2015; 122(353-362).
185. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood.* 2013; 121(1875-1885).
186. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz D, Fernandezortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;

- 95(594-599).
187. Arellano-Rodrigo E, Lopez-Vilchez I, Galan A, Molina P, Reverter JC, Carne X, et al. Coagulation Factor Concentrates Fail to Restore Alterations in Fibrin Formation Caused by Rivaroxaban or Dabigatran in Studies With Flowing Blood From Treated Healthy Volunteers. *Transfus Med Rev.* 2015; 29(242-249).
 188. Becker EM, Perzborn E, Klipp A, Lucker C, Butehorn U, Kast R, et al. Effects of rivaroxaban, acetylsalicylic acid and clopidogrel as monotherapy and in combination in a porcine model of stent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(2470-2480).
 189. Mega J, Braunwald E, Mohanavelu S, Burton P, et al. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* 2009 Jul; 374(9683)(29-38).
 190. Gibson C, Mehran R, Bode C, Halperin J, et al.. Prevention of Bleeding in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing PCI. *N Engl J Med.* 2016 Dec 22; 375(25)(2423-2434).
 191. Bhatt D. O PIONEERS! The Beginning of the End of Full-Dose Triple Therapy with Warfarin? *Circulation.* 2017 Jan 24; 135(4)(334-337).
 192. Gibson C, Pinto D, Chi G, Arbetter D, Yee M, Mehran R, et al. Recurrent Hospitalization Among Patients With Atrial Fibrillation Undergoing Intracoronary Stenting Treated With 2 Treatment Strategies of Rivaroxaban or a Dose-Adjusted Oral Vitamin K Antagonist Treatment Strategy. *Circulation.* 2017 Jan 24; 135(4)(323-333.).
 193. Foster W, Johnson J&. Phase 3 COMPASS Study of XARELTO® (rivaroxaban) Stopping Early for Efficacy in Patients with CAD or PAD. [Online].; 2017 [cited 2017 Feb 9. Available from: HYPERLINK "http://www.janssen.com/phase-3-compass-study-xarelto-rivaroxaban-stopping-early-efficacy-study-meets-primary-endpoint-0" <http://www.janssen.com/phase-3-compass-study-xarelto-rivaroxaban-stopping-early-efficacy-study-meets-primary-endpoint-0> .
 194. Stiles S. Rivaroxaban Benefit in CAD, PAD Stops Huge Randomized Trial. [Online].; 2017 [cited 2017 Feb 9. Available from: HYPERLINK "http://www.medscape.com/viewarticle/875572" <http://www.medscape.com/viewarticle/875572> .
 195. Mateo J, Santamaria A, Borrel M, Souto J, Fontcuberta J. Fisiología y exploración de la hemostasia. *Hematología clínica.* 2001;; p. 597-618.
 196. Giesen P, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon J, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;; p. 96:2311-2315.
 197. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon J, Himber J, Riederer M, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood.*

- 2000;; p. 96:170-175.
198. Falati S, Liu Q, Gross P P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* 2003;; p. 197:1585-1598.
199. Bogdanov V, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nature Medicine.* 2003;; p. 9:458-462.
200. Panes O, Matus V V, Saez C, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood.* 2007;; p. 109:5242-5250.
201. Perez-Pujol S, Aras O, Lozano M. Stored platelets contain residual amounts of tissue factor: evidence from studies on platelet concentrates stored for prolonged periods. *Transfusion.* 2005;; p. 45:572-579.
202. Chen V, Ahamed J, Versteeg H, Berndt M, Ruf W, Hogg P. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry.* 2006;; p. 45:12020-12028.
203. Wolberg A, Monroe D, Roberts H, Hoffman M. Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999;; p. 10:201-210.
204. Dietzen D, Page K, Tetzloff T. Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity. *Blood.* 2004;; p. 103:3038-3044.
205. Chen V, Ahamed J, Versteeg H, Berndt M, Ruf W, Hogg P. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry.* 2006;; p. 45:12020-12028.
206. Felmeden D, Spencer C, Chung N, Belgore F, Blann A, Beevers D, et al. Relation of thrombogenesis in systemic hypertension to angiogenesis and endothelial damage/dysfunction (a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial [ASCOT]). *Am J Cardiol.* 2003;; p. 92:400-405.
207. Lim H, Blann A, Lip G. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004;; p. 109:2524-2528.
208. Meerarani P, Badimon J, Zias E, Fuster V, Moreno P. Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med.* 2006;; p. 6:501-514.
209. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, et al. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation.* 2003;; p. 107:973-977.

210. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher T. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*. 2002;; p. 105:1756-1759.
211. Steffel J, Luscher T, Tanner F. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2006;; p. 113:722-731.
212. Zillmann A, Luther T, Muller I, Kotsch M, Spannagl M, Kauke T, et al. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;; p. 281:603-609.
213. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;; p. 36: 104-7.
214. Brandes R, Beer S, Ha T, Busse R. Withdrawal of cerivastatin induces monocyte chemoattractant protein 1 and tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;; p. 23: 1794-800.
215. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol*. 2007;; p. 35: 702-11.
216. Brambilla M, Camera M, Colnago D, Marenzi G, De Metrio M, Giesen P, et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;; p. 28: 947-53.
217. Tilley R, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res*. 2008;; p. 122: 604-9.
218. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk H, Russo L, Diani E, Finazzi G, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol*. 2011;; p. 86(4):337-42.
219. Mackman N, Tilley R, Key N. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:1687-93.
220. Müller F, Renné T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation. *Curr Opin Hematol*. 2008;(15:516-21).
221. Oliver J, Monroe D, Roberts H, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:170-177.
222. Mann K, Brummel K, Butenas S. What is all thrombin for? *J Thromb Haemostas*. 2003; 1:1504-1514.

223. Monroe D, Hoffman M. What does it take to make a perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:41-48.
224. Giannitsis E, Becker M, Kurz K, Hess G, Zdunek D. High-sensitivity cardiac troponin T for early prediction of evolving non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with suspected acute coronary syndrome and negative troponin results on admission. *Clinical chemistry.* 2010; 56(4):642-50.
225. Fox K, Cokkinos D, Deckers J, Keil U, Maggioni A, Steg G. The ENACT study: a pan-European survey of acute coronary syndromes. European Network for Acute Coronary Treatment. *European Heart Journal.* 2000; 21(17):1440-9.
226. Furman M, Dauerman H, Goldberg R, Yarzebski J, et al. Twenty-two year (1975 to 1997) trends in the incidence, in-hospital and long-term case fatality rates from initial Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction: a multihospital, community-wide perspective. *Journal of the American College of Cardiology.* 2001; 37(6):1571-80.
227. van der Pal-de Bruin K, Verkleij H, Jansen J, et al. The incidence of suspected myocardial infarction in Dutch general practice in the period 1978-1994. *European heart journal.* 1998; 19(3):429-34.
228. Bolliger D, Gorlinger K, Tanaka K. Pathophysiology and treatment of coagulopathy in massive hemorrhage and hemodilution. *Anesthesiology.* 2010; 113(1205-19).
229. Spahn D, Bouillon B, Cerny V, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care.* 2013; 17(R76).
230. Mann K, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(17-25).
231. Schochl H, Nienaber U, Hofer G, et al. Goal-directed coagulation management of major trauma patients using thromboelastometry (ROTEM)-guided administration of fibrinogen concentrate and prothrombin complex concentrate. *Crit Care.* 2010; 14(R55).
232. Fries D, Innerhofer P, Schobersberger W. Time for changing coagulation management in trauma-related massive bleeding. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009; 22(267-74).
233. Johansson P, Stissing T, Bochsén L, et al. Thrombelastography and thromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2009; 17(45).
234. Whiting D, Dinardo J. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. *Am J Hemato.* 2014; 89(2)(228-32).
235. Pengo V, Crippa L, Falanga A, Finazzi G, et al. Q&A on the use of dabigatran and perspectives on the use of other NOACs in patients with AF. A consensus document of the Italian Federation of Thrombosis Centers (FCSA). *Thromb Haemost.* 2011; 106(5)(868-76).

ANEXO

APIXABAN IN THE PREVENTION OF STROKE AND SYSTEMIC EMBOLISM IN NONVALVULAR ATRIAL FIBRILLATION

L. Pujadas-Mestres¹, G. Escolar², E. Arellano-Rodrigo² and A.M. Galán²

¹Medical Department, Bristol-Myers Squibb, Madrid, Spain; ²Servicio de Hemoterapia y Hemostasia, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

CONTENTS

Summary	425
Background	426
Chemistry	426
Preclinical pharmacology	427
Pharmacokinetics and metabolism	427
Clinical studies	428
Conclusions	433
References	433

SUMMARY

Conventional anticoagulant therapies can significantly reduce the risk of stroke and related complications in patients with atrial fibrillation (AF). Classic oral anticoagulants based on vitamin K antagonism have shown effectiveness in the prevention of thromboembolic complications in this clinical setting. Unfortunately, vitamin K antagonists that have shown effectiveness in the prevention of thromboembolic complications in patients with

nonvalvular AF hold inherent limitations including delayed onset of action, narrow therapeutic index, variability of their response, need for repeated control and numerous interactions with food and other drugs. Since the frequency of stroke related to AF increases with age, guidelines from different scientific societies advise that the risk of bleeding for a patient should be quantified before exposure to anticoagulation and balanced against the risk of stroke with and without anticoagulation. A consequence of assessing this risk/benefit balance is that not all patients with AF at thromboembolic risk receive adequate anticoagulant treatment. Apixaban is a new oral anticoagulant with a direct, specific and reversible inhibitory action on coagulation factor Xa and with demonstrated safety and

Correspondence: Ginés Escolar, MD, PhD, Senior Consultant Haematologist, Servicio de Hemoterapia-Hemostasia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: gescolar@clinic.ub.es.

efficacy in the prophylaxis and treatment of venous thromboembolism in several clinical studies involving thousands of patients subjected to major orthopedic surgery. Results of two large phase III trials have demonstrated the efficacy and safety of apixaban compared with aspirin or warfarin, in the prevention of stroke in patients with AF. Apixaban demonstrated superiority over classic vitamin K antagonists on the previously specified outcomes of stroke, systemic embolism, major bleeding and death. For those patients unsuitable for treatment with vitamin K antagonists because of an excessive bleeding risk, apixaban showed more efficacy than aspirin in stroke prevention with a not statistically significant modest increase of major bleeding.

Key words: Apixaban – Stroke – Atrial fibrillation – Coagulation factor Xa inhibitors – Anticoagulants

BACKGROUND

Atrial fibrillation (AF) is the most prevalent arrhythmia. More than 7 million people in the U.S. and E.U. may be affected by some type of arrhythmia and the prevalence of this pathology continues to augment as the life expectancy continues to increase in developed countries (1). The prevalence of AF increases dramatically with age. Ten percent of the population ≥ 80 years can suffer from AF (2). Stroke is the main thromboembolic complication of AF. Patients with AF have a 2- to 7-fold risk of ischemic stroke, with 2-fold increases in mortality and with a subsequent risk of disabling cognitive impairment (3). Stroke due to AF is more disabling than stroke due to other causes and has a higher recurrence rate. From 15% to 30% of individuals who survive a stroke are permanently disabled (4). It is agreed that the world faces a growing epidemic of AF and related stroke (3, 5).

Thromboembolic complications in AF are the result of a hypercoagulable condition developing in the heart atrium. Dimensions of the atrium, disruption of the normal blood circulation leading to a turbulent flow and alterations in the atrial wall have been involved in the thrombogenesis in AF (6). Congenital and acquired alterations in coagulation mechanisms or deficient regulation by natural anticoagulants may further contribute to the development of a procoagulant environment (7). The coagulation pathway is definitely involved in the formation of venous, arterial or atrial thrombi. In the modern cell-based model of hemostasis, coagulation is initiated through the tissue factor/coagulation factor IIa (TF/FVIIa) complex on the surface of a TF-bearing cell and involves three integrated phases: initiation, amplifi-

cation and propagation (8). Factor Xa (FXa) will play a prevalent role in the initiation and propagation phases during the cell-based activation of the coagulation. Inhibition of the coagulation steps contributed by FXa has proved a very efficient mechanism to modulate excessive thrombin generation (9). Inhibition of FXa during the initiation step reduces the initial generation of thrombin through the activation of the FXa–FVa complex on the cell surface. Moreover, inhibition of FXa during the propagation step prevents thrombin generation produced through the assembly of the prothrombinase complex (FVa–FXa and calcium).

Prevention of stroke is the key goal in AF treatment. Overwhelming clinical experience demonstrates that the risk of stroke due to AF can be reduced by two-thirds with effective anticoagulation (3). Oral anticoagulation based on vitamin K antagonists has proven efficacious in the prevention of stroke due to AF although their major drawbacks include their narrow therapeutic window, the large inter- and intraindividual variability in dose response, a slow onset and offset of action, the need for monitoring and extensive food and drug interactions (10). New strategies with more specific mechanisms of action, wider therapeutic range and with lesser pharmacological interactions are needed to optimize the prevention of the fatal or disabling embolic ischemic stroke caused by AF (11-13).

Inhibition of FXa is an efficient way of preventing thrombin generation at both the initiation and propagation steps of the coagulation mechanisms. Apixaban is a new oral anticoagulant with a direct and specific inhibitory action on FXa and with demonstrated safety and efficacy in the prophylaxis and treatment of venous thromboembolism (VTE) in several clinical trials involving thousands of patients. This review will provide an update on basic information on the pharmacology and pharmacokinetics of apixaban, and will attempt to put into perspective the results of recent clinical trials that have comparatively evaluated the antithrombotic potential of apixaban versus standard antithrombotic treatments in patients with nonvalvular AF.

CHEMISTRY

Apixaban (BMS-562247, PM-460) is a direct selective and reversible inhibitor of FXa (Fig. 1). Apixaban binds to the active site on FXa with an elevated affinity ($K_i = 0.08$ nM) and exerts its anticoagulant and antithrombotic mechanisms independently of antithrombin (14). Apixaban is a direct drug that does not require previous

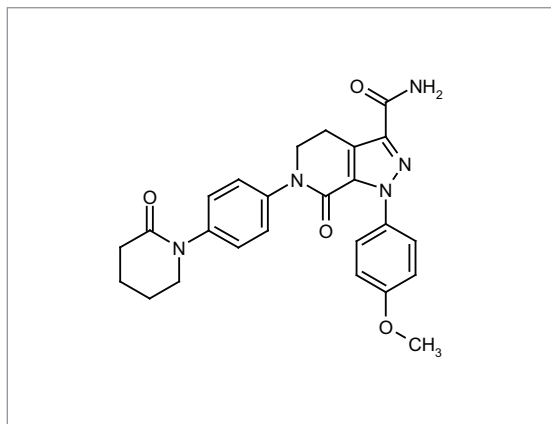


Figure 1. Chemical structure of apixaban.

biotransformation to become active. Synthesis of apixaban has been described in detail (15).

PRECLINICAL PHARMACOLOGY

The *in vitro* anticoagulant action of apixaban has been investigated in plasma from rats, rabbits, dogs and chimpanzees. Apixaban effectively prolongs prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and Hep-test (16, 17). The ability of apixaban to inhibit FXa or modify coagulation tests varies among different species. Concentrations required to double PT and APTT in the rat are 7.9 and 20 μM , respectively. Concentrations of apixaban from 3.6 to 7.4 μM added *in vitro* to human plasma are capable of doubling PT and APTT values. Apixaban inhibits thrombin generation in human plasma with a dose–effect relationship from 5 to 400 nM with an IC_{50} ranging from 70 to 100 nM (18).

The antithrombotic action of apixaban has been demonstrated in various experimental models. In rats, apixaban inhibits thrombus formation in arterial and venous vascular territories with an ED_{50} equivalent to 0.72 or 1.55 mg/kg/h, respectively. Apixaban has demonstrated antithrombotic action in a model of arteriovenous shunt in rabbits (16). In an experimental model of venous thrombosis in rabbits, concentrations of apixaban equivalent to 65 nM reduced the size of the original thrombus by up to a 50%, without significant prolongations in bleeding times (19). The antithrombotic activity shown in the previous models followed alterations in routine coagulation tests (APTT, TT and PT).

A favorable therapeutic index was observed for apixaban in comparative studies with thrombin inhibitors in a venous thrombosis model in rabbits (19). Similar antithrombotic efficacy was observed between apixaban, rivaroxaban and dabigatran in the prevention and treatment of venous thrombosis in a rabbit model. Animals treated with apixaban or rivaroxaban exhibited shorter bleeding times compared with dabigatran at equivalent antithrombotic doses. Apixaban has shown a significant potency to inhibit clot-bound FXa activity (20). Apixaban inhibits platelet aggregation induced by tissue factor. Aggregation of platelets by tissue factor is triggered by the thrombin generated during the interaction of tissue factor with FVIIa and FXa on the surface of platelets. The inhibitory action of apixaban in this experimental setting was similar to that of other specific inhibitors of FVIIa or FIIa (21).

Although new oral anticoagulants have been designed to avoid the need for repeated controls required with classic anticoagulant therapy based on vitamin K antagonism, laboratory assessment of new anticoagulants may be occasionally requested (22). Unlike vitamin K antagonists, apixaban does not need repeated adjustments of the doses. If necessary, the anticoagulant effect of apixaban can be occasionally measured even at very low plasma concentrations using a standard laboratory chromogenic anti-Xa assay with either low-molecular-weight heparin (LMWH) or apixaban calibrators (23).

The lack of specific antidotes to reverse the alterations of hemostasis induced by new oral anticoagulants in case of emergencies is a matter of concern. Recent studies using an *in vitro* model of thrombosis with circulating human blood suggest that prothrombin complex concentrates or rFVIIa could effectively reverse the anti-hemostatic action of apixaban (24).

PHARMACOKINETICS AND METABOLISM

After oral administration, 50–66% of apixaban is absorbed through the stomach and small intestine. Apixaban was found the major circulating component in plasma and *O*-demethyl apixaban sulfate was the most significant metabolite. The administered dose is recovered in feces and urine with the parent drug representing approximately half of the recovered dose. Biliary excretion represented a minor elimination pathway. Metabolic pathways identified for apixaban included *O*-demethylation, hydroxylation and sulfation of hydroxylated *O*-demethyl apixaban (25, 26).

Maximal concentration (C_{max}) is reached from 1 to 3 hours after oral administration. After single oral dose of 5 mg, the C_{max} reached is equivalent to 104 ng/mL (27). A total of 87% of the administered apixaban is found bound to proteins. As in previous studies in experimental animals, dose-dependent elevations in plasma levels of apixaban corresponded with prolongations of APTT and PT. After oral administration of multiple doses of apixaban, concentrations increased slightly above the levels observed after single administration, with an accumulation factor of 1.3 to 1.9 (28). The C_{max} for the dose of 5 mg/12 hours is slightly increased compared to the 10-mg dose in a single administration. Apixaban concentration reaches steady state after 3 days, with a half-life of about 9-14 hours.

Apixaban is oxidized through mechanisms dependent on CYP3A4 with minor contributions from a CYP2J2 and CYP1A2 isozymes. The potential of apixaban to inhibit or induce CYP or to generate active metabolites is minimal. Apixaban is a substrate of both CYP3A4 and P-glycoprotein (P-gp). Inhibitors of CYP3A4 and P-gp would increase exposure to apixaban and increase the risk of bleeding. Inducers of CYP3A4 and P-gp decrease exposure to apixaban and increase the risk of thrombosis (29). Therefore, administration of apixaban is not recommended for patients receiving concomitant systemic treatment with potent inhibitors of CYP3A4 or P-gp, such as ketoconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole, or ritonavir (30). These drugs may double the total exposure to apixaban. The exposure to apixaban could be further enhanced in the presence of additional factors that increase circulating levels of apixaban (e.g., renal dysfunction). Coadministration of apixaban with potent inducers of CYP3A4 and P-gp (rifampicin, phenytoin, carbamazepine, phenobarbital or St. John's wort) may cause a reduction of almost 50% in the apixaban levels. Coadministration of apixaban with the latter drugs should be made with reservations (30). Apixaban does not seem to have potential interactions with digoxin, but caution is advised for groups of patients receiving concomitant treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, including aspirin. The concomitant use with other inhibitors of platelet aggregation or other antithrombotic agents is not recommended. The efficacy and safety of apixaban versus warfarin was consistent in patients with or without concomitant amiodarone therapy (31).

Elimination of apixaban involves multiple mechanisms including metabolism and biliary and renal excretion of the unmodified drug. Renal clearance accounts for 27% of the total clearance. Food intake did not affect the C_{max}

or AUC of apixaban (27). The intake of foods containing high fat or calorie contents has no effect on the efficacy of apixaban (29). The C_{max} is not affected by mild to moderate renal insufficiency. There is no need for dose adjustment in patients with mild to moderate renal impairment; however, due to the lack of clinical evidence, apixaban is not recommended in patients with creatinine clearance below 15 mL/min or in those with severe hepatic impairment. Apixaban should be used with caution in patients with mild or moderate hepatic impairment (patients with Child-Pugh scores A or B). Table I summarizes the pharmacological and pharmacokinetic features detailed in the previous text.

CLINICAL STUDIES

Venous thromboprophylaxis

Patients subjected to two frequent surgical interventions, such as hip or knee replacement, are at elevated risk of developing thrombotic complications. The protection against thromboembolic complications achieved with LMWHs is perfectly established in these clinical situations. Demonstration of adequate rates of prevention of thrombosis in patients subjected to hip or knee replacement in comparison with the gold standard antithrombotic therapy with LMWH is a proof of concept for any new anticoagulant. Results from preliminary phase II studies on the therapeutic utility index for apixaban indicated that the apixaban dosage regimen with 2.5 mg twice daily (b.i.d.) could provide the highest therapeutic utility index (32).

Three phase III studies evaluated the efficacy and safety of apixaban in the prevention of thrombosis in patients undergoing major orthopedic surgery (Table II). The studies, under the acronym ADVANCE (Apixaban Dose Orally versus Anticoagulation with Enoxaparin), included more than 11,000 patients and the efficacy of oral apixaban at 2.5 mg b.i.d. was compared with that of subcutaneous enoxaparin at 30 mg b.i.d. or 40 mg once a day (33-35). Results of these clinical trials confirmed the efficacy of apixaban versus the standard treatment for the prevention of VTE with enoxaparin (36). In the ADVANCE-1 study, enoxaparin (30 mg b.i.d. as used in the U.S.) or apixaban were initiated 12-24 hours after total knee replacement surgery (33). In this study, apixaban did not reach the criteria for noninferiority for the primary efficacy endpoint compared with enoxaparin, although it showed a lower rate of major and clinically not relevant bleeding complications than enoxaparin. The ADVANCE-2 and ADVANCE-3 studies evaluated the

Table I. Summary of pharmacologic and pharmacokinetic characteristics of apixaban.

Variables	Properties	Ref.
Reference; molecular weight	BMS 562247-01; C ₂₅ H ₂₅ N ₅ O ₄ ; MW 459.49	(15)
Commercial name; licensor	Eliquis®; Bristol-Myers Squibb, Pfizer	(30)
Mechanism of action; specificity	Direct factor Xa inhibition; no prodrug	(18)
Pharmacology	Antithrombotic action in different animal models	(16-18)
Alteration in coagulation tests	TP, TTPA, TTm and Hep-test	(16, 17)
Laboratory measurement	Anti-Xa test with appropriate calibrators	(23)
Thrombin generation inhibition (IC ₅₀)	75-100 µM	(18)
Therapeutic dose	2.5, 5 mg/12 h	(32)
Pharmacokinetics: t _{max} /half-life	1-3 h/9-14 h	(25-27)
Pharmacokinetics: C _{max} at therapeutic doses	100 ng/mL after single therapeutic doses Slightly higher after multiple therapeutic doses	(25-27)
Bioavailability	Half life: 9-14 hours	(25, 26, 32)
Elimination	25% Renal secretion, 50% feces	
Interference with cytochromes and P-gp	CYP3A4 and P-gp	(29)
Strong inducers of CYP3A4 and P-gp will reduced exposure to apixaban (risk of thrombosis)	Rifampin, carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, St. John's wort	(29, 30)
Strong inhibitors of CYP3A4 and P-gp will increase the exposure to apixaban (risk of bleeding)	Ketoconazole, itraconazole, ritonavir or clarithromycin	(29, 30)
Reversal of antihemostatic action	PCCs, rFVIIa, aPCCs	(24)

Table II. Summary of clinical trials with apixaban in the prevention of thromboembolic complications.

Aim	Clinical setting and drug comparator	Number of patients	Ref.
Dose selection	Therapeutic utility of apixaban in prevention of venous thromboembolism	Model-based	(32)
Venous thromboprophylaxis after orthopedic surgery	Apixaban vs. enoxaparin knee replacement (ADVANCE 1)	3,195	(33)
	Apixaban vs. enoxaparin: knee replacement, (ADVANCE-2)	3,057	(34, 35)
	Apixaban vs. enoxaparin: hip replacement (ADVANCE-3)	3,866	(34, 35)
Prevention of thromboembolic complications in patients with atrial fibrillation	Apixaban vs. aspirin (ASA): atrial fibrillation (AVERROES)	5,599	(39)
	Apixaban vs. warfarin: atrial fibrillation (ARISTOTLE)	18,201	(40)

efficacy and safety of apixaban in the prevention of VTE in patients undergoing total knee or hip replacement, respectively. In these studies, apixaban showed noninferiority or even superiority for the primary efficacy endpoint (composite of asymptomatic or symptomatic deep

vein thrombosis, nonfatal pulmonary embolism and all-cause mortality), and superiority for the secondary endpoint of prevention of major VTE (34, 35). Bleeding complications observed in the previous studies were similar for both apixaban and enoxaparin.

Stroke related to atrial fibrillation

The major risk factors for stroke in individuals with AF are previous stroke, advanced age, history of hypertension, systolic blood pressure > 160 mmHg and diabetes. The risk of AF-related stroke can be estimated with the CHADS₂ (including Congestive heart failure, Hypertension, Age > 75 years, Diabetes mellitus, prior Stroke or transient ischemic attack [TIA] or thromboembolism) or CHA₂DS₂VASc (CHA₂DS₂ score plus Vascular disease, Age 65-74, Sex category, female) scores that represent on a scale ranging from 1 to 6 or from 1 to 9, respectively, the combined overall impact of the previous factors (3). The implicit bleeding risk from exposure to vitamin K antagonists, the complexity of management and the numerous interactions of classic oral anticoagulants have made it so that not all patients with AF with thromboembolic risk are able to receive anticoagulation treatment (37). Before the introduction of the newer oral anticoagulants, the only alternative to a vitamin K antagonist with a labeled indication for AF was antiplatelet therapy with aspirin, despite the fact that this alternative was less effective than a vitamin K antagonist for prevention of stroke.

The efficacy and safety of oral apixaban for the prevention of stroke in AF was investigated in two large, phase III, double-blind, randomized trials (Table II). The first trial, AVERROES, was designed to address the large unmet need of AF patients at risk of stroke who are unsuitable for or unwilling to take a vitamin K antagonist. Therefore, this trial compared the efficacy of apixaban versus aspirin in patients with AF and at least one risk factor for stroke who have failed or were unsuitable for vitamin K antagonist therapy (37). The second trial, ARISTOTLE wanted to determine whether apixaban was noninferior to warfarin at reducing the combined endpoint of stroke (ischemic or hemorrhagic) and systemic embolism in patients with AF and at least one additional risk factor for stroke (38).

Apixaban versus acetylsalicylic acid in atrial fibrillation: The AVERROES trial

The AVERROES (Apixaban Versus Acetylsalicylic Acid [ASA] to Prevent Stroke in Atrial Fibrillation) trial, was designed to compare the efficacy and safety of apixaban versus aspirin in patients with AF and who, for a variety of reasons, were not candidates for warfarin (39). This double-blind, double-dummy trial enrolled 5,599 patients who were randomized to receive either apixaban 5 mg b.i.d. or aspirin at a dose of 81-324 mg daily.

The primary efficacy endpoint was the occurrence of stroke (ischemic and hemorrhagic) or systemic embolism. Before enrollment, 40% of the patients had used a vitamin K antagonist.

There were 51 primary outcome events in the apixaban patients and 113 among those assigned to aspirin. The rates of death did not differ statistically for both groups (3.5% per year in the apixaban group vs. 4.4% per year in the aspirin group). There were 44 cases of major bleeding in the apixaban group and 39 in the aspirin group; there were 11 cases of intracranial bleeding with apixaban and 13 with aspirin. The risk of a first hospitalization for cardiovascular causes was significantly reduced with apixaban as compared with aspirin (Table III). As will be commented further in the text, treatment effects were consistent among important subgroups. In summary, in patients with AF for whom vitamin K antagonist therapy was unsuitable, apixaban reduced the risk of stroke or systemic embolism without significantly increasing the risk of major bleeding or intracranial bleeding. The data and safety monitoring board recommended early termination of the study because of a clear benefit in favor of apixaban.

Apixaban versus warfarin in atrial fibrillation: The ARISTOTLE trial

In the ARISTOTLE (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation) trial, apixaban was compared with warfarin for the prevention of stroke or systemic embolism in patients with AF and at least one additional risk factor for stroke (40). It was a double-blind, double-dummy design, where apixaban 5 mg b.i.d. was compared with warfarin (target international normalized ratio: 2.0 to 3.0) in 18,201 patients. The trial was designed to test the noninferiority of apixaban to warfarin in reducing the rate of ischemic or hemorrhagic stroke or systemic embolism; with key secondary endpoints of testing for superiority with respect to the primary outcome and to the rates of major bleeding and death from any cause.

As summarized in Table IV, a significant reduction was observed for the primary efficacy outcome, a composite of ischemic or hemorrhagic stroke or systemic embolism, compared with warfarin (1.27% per year vs. 1.60% per year; hazard ratio [HR] with apixaban: 0.79; 95% confidence interval [CI]: 0.66 to 0.95; $P < 0.001$ for noninferiority, $P = 0.01$ for superiority). In addition, the rate of major bleeding episodes occurred in 2.13% of patients who received apixaban and 3.09% of patients who

Table III. Efficacy and safety outcomes in the AVERROES trial (39).

Outcome	Apixaban (N = 2,808)		Aspirin (N = 2,791)		HR with apixaban (95% CI)	P value
	No. of patients with first event	Event rate (%/year)	No. of patients with first event	Event rate (%/year)		
Stroke or systemic embolism	51	1.6	113	3.7	0.45 (0.32-0.62)	< 0.001
Stroke	49	1.6	105	3.4	0.46 (0.33-0.65)	< 0.001
Ischemic	35	1.1	93	3	0.37 (0.25-0.55)	< 0.001
Hemorrhagic	6	0.2	9	0.3	0.67 (0.24-1.88)	0.45
Death from any cause	111	3.5	140	4.4	0.79 (0.62-1.02)	0.07
Major bleeding	44	1.4	39	1.2	1.13 (0.74-1.75)	0.57
Intracranial	11	0.4	13	0.4	0.85 (0.38-1.90)	0.69
Gastrointestinal	12	0.4	14	0.4	0.86 (0.40-1.86)	0.71

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

received warfarin (HR: 0.69; 95% CI: 0.60 to 0.80; $P < 0.001$). An important finding of the ARISTOTLE study was the significant reduction in the rates of hemorrhagic stroke complications. These results indicate that treatment with apixaban could result in almost a 50% reduction in the development of one of the most serious side effects observed with the current vitamin K antagonist strategies for the prevention of thromboembolic events in patients with AF. Further analysis of the results revealed that in comparison with warfarin, apixaban was associated with small, but significant reductions in the

likelihood of hospitalization in patients with AF. For every 1,000 patients treated with apixaban instead of warfarin, 13 patients avoided hospitalization an average of 1.5 times during the study (41).

The ARISTOTLE study concluded that apixaban was superior to warfarin in preventing stroke or systemic embolism, caused less bleeding and resulted in lower mortality in patients with AF (40). An indirect conclusion of the previously mentioned trial is that treatment with apixaban offers additional benefit for patients with high thromboembolic risk according to the CHADS₂ score.

Table IV. Efficacy and safety outcomes in the ARISTOTLE trial (40).

Outcome	Apixaban (N = 9,120)		Warfarin (N = 9,081)		HR with apixaban (95% CI)	P value
	No. of patients with first event	Event rate (%/year)	No. of patients with first event	Event rate (%/year)		
Stroke or systemic embolism	212	1.27	265	1.6	0.79 (0.66-0.95)	0.01
Stroke	199	1.19	250	1.51	0.79 (0.65-0.95)	0.01
Ischemic	162	0.97	175	1.05	0.92 (0.74-1.13)	0.42
Hemorrhagic	40	0.24	78	0.47	0.51 (0.35-0.75)	< 0.001
Death from any cause	603	3.52	669	3.94	0.89 (0.80-0.998)	0.047
Major bleeding	327	2.13	462	3.09	0.69 (0.60-0.80)	< 0.001
Intracranial	52	0.33	122	0.8	0.42 (0.30-0.58)	< 0.001
Gastrointestinal	105	0.76	119	0.86	0.89 (0.70-1.15)	0.37

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Apixaban was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), and the European Medicines Agency (EMA) for nonvalvular AF in 2012 based on the results of the ARISTOTLE trial (42, 43).

Efficacy and safety of apixaban in subgroups of patients with impaired renal function, previous stroke or bleeding risk

Chronic kidney disease (CKD) affects up to 10% of the adult population (44) and carries a high risk for the development of AF (45). In a large population-based study, the HR for the development of AF was doubled for the group of patients with moderate CKD compared with patients with normal renal function independent from other known risk factors for AF (46). Despite this evident increased risk for AF-associated thromboembolism, many patients with renal dysfunction are not receiving oral anticoagulation therapy (47), mostly because of bleeding risk associated with warfarin use (48).

Despite of the absence of significant subgroup interactions, secondary analysis of the AVERROES and ARISTOTLE trials were conducted to evaluate the efficacy and safety across different subgroups of patients according to their impaired renal function, the risk of stroke or their specific risk of bleeding (49, 50). The AVERROES trial included 1,697 (30%) patients with stage III CKD, showing mean glomerular filtration rates (GFRs) of 49 mL/min/1.73 m², which was an independent predictor of primary events (HR: 1.6; *P* = 0.01) and major hemorrhage (HR: 2.2; *P* = 0.02). These patients were older (mean age 75 vs. 68 years) and had more frequent hypertension, diabetes, heart failure and previous stroke (all *P* < 0.01) in comparison with patients with normal renal function (estimated GFRs ≥ 60 mL/min/1.73 m²). The efficacy of apixaban was consistent across these subgroups, with a significant reduction of primary events by 68% (1.8% per year on apixaban vs. 5.6% per year on aspirin; *P* < 0.001) for stage III CKD patients and by 43% (1.6% per year on apixaban vs. 2.8% per year on aspirin; *P* = 0.009) for patients with normal renal function. Treatment with apixaban was associated with a nonsignificant difference in major hemorrhage for patients with stage III CKD (2.5% per year with apixaban vs. 2.2% per year with aspirin). Results were similar in a secondary analysis of the ARISTOTLE trial (50). This study included 7,518 patients (42%) with an estimated GFR of > 80 mL/min, 7,587 (42%) patients with an estimated GFR between > 50 and 80 mL/min, and 3,017 (15%) patients with an estimated GFR of ≤ 50 mL/min. Patients with impaired renal function (≤ 80 mL/min) had a higher rate of car-

diovascular events and bleeding. Compared with warfarin, the incidence of stroke or systemic embolism, major bleeding and mortality was significantly decreased in patients who received apixaban irrespective of renal function. In fact, the risk reduction in major bleeding was greater in patients with an estimated GFR of ≤ 50 mL/min (*P* = 0.005).

It is well established that patients with AF and previous stroke or TIA have a high risk of stroke. To confirm this assumption and to compare the efficacy of apixaban in patients with and without previous stroke or TIA, a pre-specified AVERROES subgroup analysis was performed (51). In patients with previous stroke or TIA, 2.39% events of stroke or systemic embolism per year occurred in the apixaban group compared with 9.16% in the aspirin group (HR: 0.29; 95% CI: 0.15-0.60). Additionally, major bleeding was more frequent in patients with a history of stroke or TIA than in patients without (HR: 2.88; 95% CI: 1.77-4.55) but risk for this event did not differ between treatment groups.

In the ARISTOTLE subgroup analysis of patients with previous stroke or TIA, the incidence of stroke or systemic embolism was 2.46 per 100 patient-years in the apixaban group and 3.24 in the warfarin group (HR: 0.76; 95% CI: 0.56 to 1.03) (52). However, differences did not reach levels of statistical significance in patients without previous stroke or TIA (1.01 per 100 patient-years with apixaban and 1.23 with warfarin; HR: 0.82; 95% CI: 0.65-1.03). Thus, the absolute reduction in the rate of stroke and systemic embolism with apixaban in comparison with warfarin was 0.77 per 100 patient-years (95% CI: -0.08 to 1.63) in patients with previous stroke or TIA and 0.22 (95% CI: -0.03 to 0.47) in those without previous stroke or TIA. The incidence of major bleeding was similar in patients with and without a previous history of stroke or TIA according to received treatment (1.07 per 100 patient-years with apixaban [95% CI: 0.09-2.04] vs. 0.93 with warfarin [95% CI 0.54-1.32]). The investigators concluded that apixaban was particularly effective for patients with previous stroke or TIA.

Treatment with anticoagulants increases the risk of bleeding for the exposed population of patients. The bleeding risk assumed with anticoagulants should be balanced with respect to the underlying risk of stroke in the absence of treatment (53). The risk of stroke can be evaluated through the CHADS₂ scores. A similar score evaluation has been applied to evaluate the risk of bleeding. Thus, the HAS-BLED score (Hypertension, Abnormal Renal/Liver Function, Stroke, Bleeding

History or Predisposition, Labile INR, Elderly, Drugs or alcohol) has been validated for cohorts of patients subjected to anticoagulant treatments. A HAS-BLED score of more than 3 identifies patients with AF at high bleeding risk (54). In a subanalysis of the AVERROES trial, apixaban was found to reduce stroke with comparable bleeding risks when compared with aspirin (55). Therefore, the rates of both stroke and bleeding increased with higher CHADS₂ scores, but apixaban compared with aspirin was associated with a similar risk of anatomic site of bleeding and a reduced relative risk of stroke. Lip et al. performed a secondary analysis of the AVERROES trial to confirm that there were no significant heterogeneities in the risk of bleeding between treated groups (56). Outcomes were consistent regardless of baseline risk. Apixaban was superior to aspirin for stroke prevention in AF population, with similar rates of major bleeding, in the presence of one or more stroke risk factors, with consistency of the treatment effect by CHADS₂/CHA₂DS₂-VASc scores. A secondary analysis of the ARISTOTLE confirmed that the relative risk reduction in intracranial bleeding tended to be greater in patients with HAS-BLED scores of 3 or higher (HR: 0.22; 95% CI: 0.10-0.48) than in those with HAS-BLED scores of 0-1 (HR: 0.66; 95% CI: 0.39-1.12; *P* for interaction = 0.0604) (57). Therefore, apixaban has benefits compared with warfarin that are consistent across patient risk of stroke and bleeding as assessed by the CHADS₂, CHA₂DS₂-VASc, and HAS-BLED scores.

CONCLUSIONS

AF and related thrombotic complications are important contributors to mortality and morbidity in our societies and represent a major health concern. The steadily rising prevalence and incidence of AF is bound to contribute to a progressive increase in the social and economic burden of stroke and related disabilities. Apixaban is a new oral anticoagulant with a direct, specific and reversible inhibitory action on FXa. Apixaban offers several advantages over classic vitamin K antagonists: effects are reliable at adjusted doses, repeated controls are unnecessary and its reduced half-life predicts a relatively rapid recovery of coagulation mechanisms after the treatment is discontinued. In addition, apixaban shows fewer interactions with food or other drugs and its metabolism seems to be less dependent on cytochrome-related polymorphisms. Apixaban has demonstrated safety and efficacy in the prophylaxis and treatment of VTE, and in the prevention of thromboembolic complications in patients with AF in several clinical studies involving

thousands of patients. Based on the results of the ARISTOTLE studies, the FDA and EMA have recently approved apixaban for the prevention of thromboembolic complications in patients with AF (42, 43). Two phase III clinical trials have investigated the efficacy and safety of apixaban for the acute and extended treatment of VTE (58, 59). Based on the results of these trials, the licensing company may plan to initiate regulatory filings for the approval of new indications on acute and long-term treatment of VTE, as well as for extended prevention of recurrent VTE.

DISCLOSURES AND ACKNOWLEDGMENTS

Lluís Pujadas-Mestres is an employee of Bristol-Myers Squibb. Dr. Gines Escolar has received honoraria/consultant fees from Bayer, Bristol-Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, CSL Behring and Novo Nordisk. Dr. Eduardo Arellano-Rodrigo and Dr. Ana Maria Galan declare no conflicts of interest.

This work was partially supported by grants FIS EC10-070, SAF2009-10365, FIS (CP04-00112, PS09/00664), SAF2011-28214 and Red HERACLES RD06/0009/1003-0015 from the Spanish Government. Dr. A.M. Galan belongs to the Miguel Servet Researcher's stabilization program of "Instituto de Salud Carlos III" from the Spanish government and "Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut" from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

1. Lip, G.Y., Brechin, C.M., Lane, D.A. *The global burden of atrial fibrillation and stroke: a systematic review of the epidemiology of atrial fibrillation in regions outside North America and Europe*. Chest 2012, 142(6): 1489-98.
2. Heeringa, J., van der Kuip, D.A., Hofman, A. et al. *Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study*. Eur Heart J 2006, 27(8): 949-53.
3. Albers, M.J., Eikelboom, J.W., Hankey, G.J. *Antithrombotic therapy for stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation*. Lancet Neurol 2012, 11(12): 1066-81.
4. Menke, J., Luthje, L., Kastrup, A., Larsen, J. *Thromboembolism in atrial fibrillation*. Am J Cardiol 2010, 105(4): 502-10.
5. Fuster, V., Ryden, L.E., Cannom, D.S. et al. *2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart*

- Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2011, 123(10): e269-367.
6. Watson, T., Shantsila, E., Lip, G.Y. *Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited*. *Lancet* 2009, 373(9658): 155-66.
 7. Nörstrom, E., Escolar, G. *Natural anticoagulants and thrombophilia*. In: Vol. Blood and Bone Marrow Pathology 2nd Edition. A. Porwit, J. McCullough, W.N. Erber (Eds.). Elsevier: 2011, 569-81.
 8. Roberts, H.R., Hoffman, M., Monroe, D.M. *A cell-based model of thrombin generation*. *Semin Thromb Hemost* 2006, 32(Suppl. 1): 32-8.
 9. Ben-Hadj-Khalifa, S., Hezard, N., Almawi, W.Y., Remy, M.G., Florent, B., Mahjoub, T., Nguyen, P. *Differential coagulation inhibitory effect of fondaparinux, enoxaparin and unfractionated heparin in cell models of thrombin generation*. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011, 22(5): 369-73.
 10. Hirsh, J. *New anticoagulants*. *Am Heart J* 2001, 142(2 Suppl): S3-8.
 11. Weitz, J.I., Hirsh, J., Samama, M.M. *New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. *Chest* 2004, 126(3 Suppl): 265S-86S.
 12. Weitz, J.I., Bates, S.M. *New anticoagulants*. *J Thromb Haemost* 2005, 3(8): 1843-53.
 13. Bauer, K.A. *New anticoagulants*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 450-6.
 14. Pinto, D.J., Orwat, M.J., Koch, S. et al. *Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa*. *J Med Chem* 2007, 50(22): 5339-56.
 15. Bates, S.M., Weitz, J.I., Serradell, N., Rosa, E., Bolos, J. *Apixaban. Factor Xa inhibitor, anticoagulant*. *Drugs Fut* 2008, 33(4): 293-301.
 16. Wong, P.C., Pinto, D.J., Zhang, D. *Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor*. *J Thromb Thrombolysis* 2011, 31(4): 478-92.
 17. He, K., Luetzgen, J.M., Zhang, D. et al. *Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2011, 36(3): 129-39.
 18. Luetzgen, J.M., Wang, Z., Seiffert, D.A., Rendina, A.R., Knabb, R.M., Ogletree, M.L. *Inhibition of measured thrombin generation in human plasma by apixaban: a predictive mathematical model based on experimentally determined rate constants*. 21st Congr Int Soc Thromb Haemost (ISTH) (July 6-12, Geneva) 2007, Abst P-T-633
 19. Wong, P.C., Crain, E.J., Watson, C.A., Xin, B. *Favorable therapeutic index of the direct factor Xa inhibitors, apixaban and rivaroxaban, compared with the thrombin inhibitor dabigatran in rabbits*. *J Thromb Haemost* 2009, 7(8): 1313-20.
 20. Jiang, X., Crain, E.J., Luetzgen, J.M., Schumacher, W.A., Wong, P.C. *Apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor, inhibits human clot-bound factor Xa activity in vitro*. *Thromb Haemost* 2009, 101(4): 780-2.
 21. Wong, P.C., Jiang, X. *Apixaban, a direct factor Xa inhibitor, inhibits tissue-factor induced human platelet aggregation in vitro: comparison with direct inhibitors of factor VIIIa, XIa and thrombin*. *Thromb Haemost* 2010, 104(2): 302-10.
 22. Samama, M.M., Guinet, C. *Laboratory assessment of new anticoagulants*. *Clin Chem Lab Med* 2011, 49(5): 761-72.
 23. Becker, R.C., Yang, H., Barrett, Y., Mohan, P., Wang, J., Wallentin, L., Alexander, J.H. *Chromogenic laboratory assays to measure the factor Xa-inhibiting properties of apixaban—an oral, direct and selective factor Xa inhibitor*. *J Thromb Thrombolysis* 2011, 32(2): 183-7.
 24. Escolar, G., Areiliano-Rodrigo, E., Reverter, J.C. et al. *Coagulation factor concentrates restore alterations in hemostasis induced by a high dose of apixaban: Studies in vitro with circulating human blood*. 54th Annu Meet Am Soc Hematol (Dec 8-11, Atlanta) 2012, Abst 2263
 25. Wang, L., Raghavan, N., He, K. et al. *Sulfation of o-demethyl apixaban: enzyme identification and species comparison*. *Drug Metab Dispos* 2009, 37(4): 802-8.
 26. Raghavan, N., Frost, C.E., Yu, Z. et al. *Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans*. *Drug Metab Dispos* 2009, 37(1): 74-81.
 27. Frost, C., Wang, J., Nepal, S. et al. *Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects*. *Br J Clin Pharmacol* 2013, 75(2): 476-87.
 28. Frost, C., Yu, Z., Moore, K., et al. *Apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor: Multiple-dose safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in healthy subjects*. 21st Congr Int Soc Thromb Haemost (ISTH) (July 6-12, Geneva) 2007, Abst P-M-664
 29. Prom, R., Spinler, S.A. *The role of apixaban for venous and arterial thromboembolic disease*. *Ann Pharmacother* 2011, 45(10): 1262-83.
 30. *ELIQUIS prescribing information*. http://packageinserts.bms.com/pi/pi_eliquis.pdf. Accessed
 31. Flaker, G.C., Hohnloser, S., Wojdyła, D. et al. *Apixaban is efficacious and safe in patients with atrial fibrillation using concomitant amiodarone: An analysis from the ARISTOTLE trial*. 62nd Annu Sci Sess Am Coll Cardiol (ACC) (March 9-11, San Francisco) 2013, Abst 914-6.
 32. Leil, T.A., Feng, Y., Zhang, L., Paccaly, A., Mohan, P., Pfister, M. *Quantification of apixaban's therapeutic utility in prevention of venous thromboembolism: selection of phase III trial dose*. *Clin Pharmacol Ther* 2010, 88(3): 375-82.
 33. Lassen, M.R., Raskob, G.E., Gallus, A., Pineo, G., Chen, D., Portman, R.J. *Apixaban or enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement*. *N Engl J Med* 2009, 361(6): 594-604.

34. Lassen, M.R., Raskob, G.E., Gallus, A., Pineo, G., Chen, D., Hornick, P. *Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial*. *Lancet* 2010, 375(9717): 807-15.
35. Lassen, M.R., Gallus, A., Raskob, G.E., Pineo, G., Chen, D., Ramirez, L.M. *Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement*. *N Engl J Med* 2010, 363(26): 2487-98.
36. Lassen, M.R. *Practical use of apixaban in the prevention of venous thromboembolism after total knee or hip replacement*. *Drugs Today (Barc)* 2012, 48(4): 249-58.
37. Eikelboom, J.W., O'Donnell, M., Yusuf, S. et al. *Rationale and design of AVERROES: apixaban versus acetylsalicylic acid to prevent stroke in atrial fibrillation patients who have failed or are unsuitable for vitamin K antagonist treatment*. *Am Heart J* 2010, 159(3): 348-53 e1.
38. Lopes, R.D., Alexander, J.H., Al-Khatib, S.M. et al. *Apixaban for reduction in stroke and other Thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) trial: design and rationale*. *Am Heart J* 2010, 159(3): 331-9.
39. Connolly, S.J., Eikelboom, J., Joyner, C. et al. *Apixaban in patients with atrial fibrillation*. *N Engl J Med* 2011, 364(9): 806-17.
40. Granger, C.B., Alexander, J.H., McMurray, J.J. et al. *Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. *N Engl J Med* 2011, 365(11): 981-92.
41. Cowper, P.A., Pan, W., Anstrom, K., et al. *Apixaban reduces hospitalization in patients with atrial fibrillation: An analysis of the effect of apixaban therapy on resource use in the apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation trial*. 62nd Annu Sci Sess Am Coll Cardiol (ACC) (March 9-11, San Francisco) 2013, Abst 1245-108.
42. Bristol-Myers Squibb and Pfizer announce U.S. FDA approval of ELIQUIS(R) (apixaban) [news release]. Bristol-Myers Squibb, December 28, 2012. Accessed July 23, 2013.
43. ELIQUIS(R) (apixaban) approved in Europe for prevention of stroke and systemic embolism in patients with nonvalvular atrial fibrillation [news release]. Bristol-Myers Squibb, November 20, 2012. Accessed July 23, 2013.
44. Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L.A. et al. *Prevalence of chronic kidney disease in the United States*. *JAMA* 2007, 298(17): 2038-47.
45. Soliman, E.Z., Prineas, R.J., Go, A.S. et al. *Chronic kidney disease and prevalent atrial fibrillation: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC)*. *Am Heart J* 2010, 159(6): 1102-7.
46. Alonso, A., Lopez, F.L., Matsushita, K. et al. *Chronic kidney disease is associated with the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. *Circulation* 2011, 123(25): 2946-53.
47. Piccini, J.P., Hernandez, A.F., Zhao, X., Patel, M.R., Lewis, W.R., Peterson, E.D., Fonarow, G.C. *Quality of care for atrial fibrillation among patients hospitalized for heart failure*. *J Am Coll Cardiol* 2009, 54(14): 1280-9.
48. Marinigh, R., Lane, D.A., Lip, G.Y. *Severe renal impairment and stroke prevention in atrial fibrillation: implications for thromboprophylaxis and bleeding risk*. *J Am Coll Cardiol* 2011, 57(12): 1339-48.
49. Eikelboom, J.W., Connolly, S.J., Gao, P. et al. *Stroke risk and efficacy of apixaban in atrial fibrillation patients with moderate chronic kidney disease*. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2012, 21(6): 429-35.
50. Hohnloser, S.H., Hijazi, Z., Thomas, L. et al. *Efficacy of apixaban when compared with warfarin in relation to renal function in patients with atrial fibrillation: insights from the ARISTOTLE trial*. *Eur Heart J* 2012, 33(22): 2821-30.
51. Diener, H.C., Eikelboom, J., Connolly, S.J. et al. *Apixaban versus aspirin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a predefined subgroup analysis from AVERROES, a randomised trial*. *Lancet Neurol* 2012, 11(3): 225-31.
52. Easton, J.D., Lopes, R.D., Bahit, M.C. et al. *Apixaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of the ARISTOTLE trial*. *Lancet Neurol* 2012, 11(6): 503-11.
53. Camm, A.J., Lip, G.Y., De Caterina, R. et al. *2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation—developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association*. *Europace* 2012, 14(10): 1385-413.
54. Lip, G.Y., Frison, L., Halperin, J.L., Lane, D.A. *Comparative validation of a novel risk score for predicting bleeding risk in anticoagulated patients with atrial fibrillation: the HAS-BLED (Hypertension, Abnormal Renal/Liver Function, Stroke, Bleeding History or Predisposition, Labile INR, Elderly, Drugs/Alcohol Concomitantly) score*. *J Am Coll Cardiol* 2011, 57(2): 173-80.
55. Flaker, G.C., Eikelboom, J.W., Shestakovska, O. et al. *Bleeding during treatment with aspirin versus apixaban in patients with atrial fibrillation unsuitable for warfarin: the apixaban versus acetylsalicylic acid to prevent stroke in atrial fibrillation patients who have failed or are unsuitable for vitamin K antagonist treatment (AVERROES) trial*. *Stroke* 2012, 43(12): 3291-7.
56. Lip, G.Y., Connolly, S., Yusuf, S. et al. *Modification of outcomes with aspirin or apixaban in relation to CHADS(2) and CHA(2)DS(2)-VASc scores in patients with atrial fibrillation: a secondary analysis of the AVERROES study*. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013, 6(1): 31-8.
57. Lopes, R.D., Al-Khatib, S.M., Wallentin, L. et al. *Efficacy and safety of apixaban compared with warfarin according to patient risk of stroke and of bleeding in atrial fibrillation: a secondary analysis of a randomised controlled trial*. *Lancet* 2012, 380(9855): 1749-58.

58. Agnelli, G., Buller, H. R., Cohen, A. et al. *Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism*. N Engl J Med 2013, Advance publication.
59. Agnelli, G., Buller, H. R., Cohen, A. et al. *Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism*. N Engl J Med 2013, 368(8): 699-708.

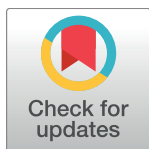
RESEARCH ARTICLE

Differential inhibitory action of apixaban on platelet and fibrin components of forming thrombi: Studies with circulating blood and in a platelet-based model of thrombin generation

Lluís Pujadas-Mestres^{1☯}, Irene Lopez-Vilchez^{1☯}, Eduardo Arellano-Rodrigo¹, Joan Carles Reverter¹, Antonio Lopez-Farre², Maribel Diaz-Ricart¹, Juan Jose Badimon³, Gines Escolar^{1*}

1 Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clinic of Barcelona, Centre of Biomedical Diagnosis (CDB), Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Medicine, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain, **3** Atherothrombosis Research Unit, Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, United States of America

☯ These authors contributed equally to this work.
 ✉ Current address: Medical Department, Biogen Spain S.L., Madrid, Spain
 * gescolar@clinic.ub.es



OPEN ACCESS

Citation: Pujadas-Mestres L, Lopez-Vilchez I, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Lopez-Farre A, Diaz-Ricart M, et al. (2017) Differential inhibitory action of apixaban on platelet and fibrin components of forming thrombi: Studies with circulating blood and in a platelet-based model of thrombin generation. PLoS ONE 12(2): e0171486. doi:10.1371/journal.pone.0171486

Editor: Christoph E Hagemeyer, Monash University, AUSTRALIA

Received: September 21, 2016

Accepted: January 20, 2017

Published: February 13, 2017

Copyright: © 2017 Pujadas-Mestres et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: This work was partially supported by the Health Institute Carlos III (ISCIII): Health Research Funds (FIS-PI13/00517) and Cardiovascular Research Net (RIC) RD12/0042/0016 and RD12/0042/0040 together with the European Regional Development Funds (FEDER) and Integrated

Abstract

Introduction

Mechanisms of action of direct oral anticoagulants (DOAC) suggest a potential therapeutic use in the prevention of thrombotic complications in arterial territories. However, effects of DOACs on platelet activation and aggregation have not been explored in detail. We have investigated the effects of apixaban on platelet and fibrin components of thrombus formation under static and flow conditions.

Methods

We assessed the effects of apixaban (10, 40 and 160 ng/mL) on: 1) platelet deposition and fibrin formation onto a thrombogenic surface, with blood circulating at arterial shear-rates; 2) viscoelastic properties of forming clots, and 3) thrombin generation in a cell-model of coagulation primed by platelets.

Results

In studies with flowing blood, only the highest concentration of apixaban, equivalent to the therapeutic C_{max} , was capable to significantly reduce thrombus formation, fibrin association and platelet-aggregate formation. Apixaban significantly prolonged thromboelastometry parameters, but did not affect clot firmness. Interestingly, results in a platelet-based model of thrombin generation under more static conditions, revealed a dose dependent persistent inhibitory action by apixaban, with concentrations 4 to 16 times below the therapeutic C_{max}

Excellence Project in Health Institutes PIE15/00027; from the Spanish government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

significantly prolonging kinetic parameters and reducing the total amount of thrombin generated.

Conclusions

Our studies demonstrate the critical impact of rheological conditions on the antithrombotic effects of apixaban. Studies under flow conditions combined with modified thrombin generation assays could help discriminating concentrations of apixaban that prevent excessive platelet accumulation, from those that deeply impair fibrin formation and may unnecessarily compromise hemostasis.

Introduction

Platelets contribute to the precipitating events leading to acute coronary occlusion [1]. Plaque disruption facilitates the interaction of flowing blood with the inner components of atherosclerotic lesions, collagen and tissue factor among them; leading to local thrombin generation and acute thrombus formation [2]. Mechanisms by which plaque rupture leads to occlusive or non-occlusive thrombi are complex and probably potentiated by the presence and/or transport of hyper-reactive platelets and soluble agonists, such as thrombin towards the injured vessel [3]. Occlusive events in arterial vessels occur under a wide range of hemodynamic conditions, ranging from extreme to depressed flows, including situations with turbulences or stasis in pathological stenotic vessels.

It has been proposed that exposure of vascular tissue factor (TF) at sites of disrupted atherosclerotic plaques plays a critical role in the local generation of thrombin favoring the growth of occlusive thrombi. Assembly of the TF-FVIIa complex on the anionic phospholipids expressed at the activated cell-membranes is important for optimal thrombin generation and blood coagulation. Actual models of coagulation contemplate the implication of cellular and enzymatic mechanisms in three differentiated steps: initial activation, propagation and thrombin generation [4,5,6]. Although the more recent cell-based model of coagulation does not take into account the elevated shear rate conditions usually involved in the onset of acute coronary events, the concepts may still apply to post-stenotic arterial territories or during the consolidation of occlusive thrombi characterized by slow flow or even almost static conditions.

Blood flow conditions, and more specifically blood shear rates, are essential in the pathophysiology of venous and arterial thrombotic complications [7]. Interaction of platelets with a damaged vessel wall and thrombus formation are shear-dependent processes [8]. Besides, rheological properties of blood locate circulating platelets close to the boundary layer, where they recognize and interact with elements of the subendothelium exposed upon vessel damage. Rupture of an atherosclerotic plaque, will expose tissue factor and collagen to the bloodstream and to platelets, triggering the formation of a thrombus and subsequent ischemic complications of acute coronary syndromes (ACS) [9,10]. The size, stability and composition of this thrombus will determine the severity of the ACS [11,12].

Thrombi generated on a ruptured plaque contain platelets and fibrin [12]. The initial activation and aggregation of platelets are important processes in thrombus formation; however, its stability is dependent on their fibrin content and polymerization. Disrupted atherosclerotic lesions are rheologically characterized by increasing shear rates reaching maximal levels at the apex of the stenosis. These high shear rate conditions are magnified by the occlusive nature of the forming thrombus on the disrupted lesion. Distal to the apex, the local shear rate

progressively decelerates and even switches to negative values due to distal post-thrombus turbulence [13–15]. Reduced flow conditions at the proximal and distal portions of the growing thrombi favor local thrombin generation, therefore increasing the stability of the thrombi by incorporating additional platelets into a polymerizing fibrin mesh.

Antiplatelet agents and anticoagulants therapies such as heparins have proven clinically successful, though a significant number of recurrent events may still occur. Direct oral anticoagulants (DOACs) can be considered equally effective than warfarin, but safer and easier to use. Despite these advantages, there is limited information on the effects of DOACs in the ACS setting; and the possible synergism of a combined antiplatelet plus anticoagulant therapy has not been investigated in detail [16]. The well-established inhibitory activity of DOACs on thrombin generation should be considered a major asset; however, their effect on platelet-mediated procoagulant activity has not been explored yet. In fact, some clinical studies have shown contradictory results depending on the DOAC and doses investigated [17].

In summary, platelet activation, local thrombin generation and fibrin formation are three key elements contributing to the formation of occlusive thrombi in arterial territories. The mechanisms of action of DOACs support their potential therapeutic use in the prevention of thrombotic complications in arterial vasculature however effects of these agents on platelet activation and aggregation have not been investigated in detail. In the present studies, we have applied experimental approaches under dynamic and steady flow conditions to investigate the effects of apixaban on different aspects of thrombus formation. More specifically, we assessed the inhibitory effects of apixaban on: 1) platelet deposition and fibrin formation onto a thrombogenic surface, in an experimental model of thrombosis with blood circulating at arterial shear-rates; 2) clot formation kinetics using thromboelastometry; and 3) thrombin generation applying a cell-based model of coagulation primed by platelets.

Materials and methods

Our investigations conform with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes; and with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study has been approved by the Hospital Clinic Ethical Committee of Clinical Investigation (CEIC registry: 2011/6837). Healthy donors provided an informed written consent before collection of blood samples. The protocol to isolate rabbit aortas, to be used as thrombogenic substrata, was also approved by the Animal Ethical Committee of the University of Barcelona (CEEA registry: 473/12). Rabbits were handled following the applicable regulations and guidelines of the Animal Experimental Ethics Committee of the University of Barcelona.

Experimental design

The aim of the present study was to assess the effects of apixaban at therapeutic and subtherapeutic doses in different models of hemostasis: 1) Modifications in the adhesive-cohesive properties of platelets and in fibrin formation were evaluated with perfusion devices, using whole blood circulated through damaged vascular segments, and a shear rate similar to those found at medium-sized arteries; 2) changes in thromboelastometry parameters during clot formation of citrated blood; and 3) contribution of platelets to kinetics of local thrombin generation, using an *in house* cell-based model of thrombin generation primed by platelets, in a fluorimetric assay with a fluorogenic substrate (Technoclone GmbH, Austria).

Reagents

Phosphate buffered saline (PBS) was from Gibco BRL Life Technologies (Paisley, UK). The embedding kit JB-4 for histological processing was from Polyscience (Warrington, USA). ROTEM Thromboelastometry reagents, ex-TEM[®] and star-TEM[®], were from Pentapharm GmbH (Munich, Germany). Thrombin generation was assessed with the fluorogenic substrate from Technoclone GmbH (Vienna, Austria). Tissue factor exposed on phospholipid vesicles to trigger thrombin generation was Thromborel[®]S, from Siemens Healthcare (Marburg, Germany).

Apixaban

The apixaban principle was kindly provided by Bristol-Myers Squibb (NY, USA). Apixaban was initially dissolved in ethanol, and subsequently diluted in saline to a final stock concentration of 1 µg/mL. Blood samples were incubated with different concentrations of apixaban (0, 10, 40 and 160 ng/mL) for 30 min at 37°C. The 160 ng/mL concentration is equivalent to the C_{max} at steady state after a 5 mg twice daily dosage, recommended for the thromboprophylaxis in patients with atrial fibrillation [18]. The 40 ng/mL is compatible with the C_{min} after the same treatment regimen, and the 10 ng/mL would be compatible with the C_{min} achieved after a single administration of 2.5 mg apixaban [19].

Blood collection and platelets isolation

Blood samples were drawn from healthy donors who in the previous 10 days had not taken any drug known to affect platelets or the coagulation system. Blood was collected into BD Vacutainer[™] citrate tubes leading to a final citrate concentration of 11 mM. For thrombin generation studies, whole blood was separated into plasma and isolated platelets. Citrated plasma was obtained by centrifugation of tubes at 1100xg for 5 min. Platelets were separated as platelet-rich plasma (120xg, 7 min) and washed 3-times with a buffer containing 93 mM sodium citrate, 7 mM citric acid, 140 mM dextrose, 5 mM adenosine and 3 mM theophylline (pH 6.5). The final pellet was resuspended at 1×10^6 platelets/µL in Hanks' balanced salt solution (136.8 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.6 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.2 mM NaH₂PO₄·2H₂O) supplemented with 2.7 mM dextrose and 4.1 mM NaHCO₃ (pH 7.2). Platelets suspensions were allowed to rest at 37°C for 30 min [20].

Perfusion studies

Whole blood aliquots incubated with apixaban were recalcified with a CaCl₂ solution, and immediately perfused through annular chambers exposing a damaged vascular segment from rabbit aorta, as thrombogenic substrata [21].

Preparation of thrombogenic surfaces

Aortas were extracted from young female New Zealand rabbits (2.8–3.0 Kg; <http://www.granjasanbernardo.com/>). Rabbits were sedated with a combination of intramuscular ketamine (30 mg/Kg) + xylazine (5 mg/Kg), and further euthanized using an overdose of anesthetic (intravenous sodium pentobarbital; 500 mg/Kg). Death was confirmed by total bleeding. Rabbits were cut open to cannulate the venae cavae at the jointure between the renal and iliac veins, establishing a constant flow of saline solution in order to clean the entire vascular circuit, avoiding the formation of clots that could adhere to the endothelium. The aorta was removed by a cut at the point where the two iliacs separate. Extracted vessels were denuded, everted and cut into six segments of 1 cm length. The endothelial layer was chemically removed with 20 U/

mL α -chymotrypsin (37°C, overnight), to expose the subendothelium proteins. Vascular segments were stored in PBS at -20°C until used. Each experiment was performed with vessels from the same rabbit, to avoid inter-individual variations.

Studies with flowing blood

Whole blood aliquots incubated with apixaban were recalcified with a CaCl₂ solution, and immediately perfused through annular chambers exposing damaged vascular segments [21]. Perfusion studies were performed at a shear rate of 800 s⁻¹, for 5 min. Perfused vessels were rinsed with 0.15 M PBS, fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.15 M PBS at 4°C for 24 h and histologically processed for further morphometric evaluation. Fibrin deposition and platelet interactions were evaluated by light microscopy in histological semi-thin cross-sections of the perfused vessels. A specifically developed software automatically classified and quantified platelet and fibrin coverage present in 20 randomly chosen microscopic fields in non-adjacent sections [22]. Platelet interactions with the exposed vascular surfaces were evaluated as a percentage of total surface of the vessel covered by platelet. Presence of larger platelet masses (aggregates of more than 5 µm in height) were also expressed as a percentage of the surface vessel. Similarly, the presence of fibrin in the same microscopic fields was also morphometrically quantified and expressed as a percentage of fibrin coverage deposited on the subendothelium.

Thromboelastometry studies

Modifications on thromboelastometric parameters during clot formation of citrated blood samples previously incubated with apixaban (0, 10, 40 and 160 ng/mL) were investigated using the ROTEM Thromboelastometry Analyser (Pentapharm GmbH, München, Germany) [21]. Clot formation was triggered by addition of ex-TEM[®] reagent and recalcification with star-TEM[®], both commercially available. The ex-TEM[®] test measures changes on the extrinsic pathway of coagulation, fibrinogen and fibrin polymerization, and platelet function. Clots obtained in the ex-TEM[®] are composed of platelets and fibrin. Clotting time (CT) and clot formation time (CFT) indicate the kinetics of clot formation and are expressed in seconds. Clot amplitude provides information about clot strength and stability, which is largely dependent on fibrinogen and platelets, and is expressed in millimetres. The CT is defined as the time when the forming clot reaches 2 mm; the CFT is the time when this clot reaches 20 mm; and the clot amplitude after 10 minutes (A10) is a measure of clot firmness at this time-point.

A platelet-based model of thrombin generation

Contribution of platelets to local thrombin generation was investigated in an *in house* cell-based model of thrombin generation primed by platelets, using a modified fluorogenic assay (Technoclone GmbH, Austria). Our cell-based model consists of isolated platelets at 1x10⁶ platelets/µL in Hanks' balanced salt solution, used as the source of anionic phospholipids and factors released from the granules after activation to enhance thrombin generation. Addition of 7.5% of citrated plasma ensured the presence of coagulation factors to support thrombin generation. This mix was incubated with the different concentrations of apixaban tested (0, 10, 40 and 160 ng/mL) for 30 min at 37°C. Parallel studies were performed using vehicle instead of platelets (S1 Supporting Information). Thrombin generation was initiated by addition of 1.1 pM tissue factor exposed on phospholipids micelles (Thromborel[®]S, Dade Behring, Marburg GmbH, Germany) and a fluorogenic substrate that also contains CaCl₂ to favor the activation of coagulation mechanisms. Fluorescence generated was evaluated at a wavelength of 390 nm / 450 nm (excitation / emission) during 90 min (at intervals of 1 min) and fluorescence units analyzed with the Thermo Fluoroskan Ascent Software (Technoclone GmbH) as previously

described [23]. Parameters assessed in our studies were lag phase (min), maximum thrombin peak (nM), time to achieve this peak (min) and total amount of thrombin generated (Area Under the Curve, A.U.C.).

Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The SPSS statistical package 17.0.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL) was used for all analyses. Statistical analysis was performed with raw data using the Student's t-test for paired samples after Wilcoxon-Mann-Whitney test for Gaussian distribution. Minimal levels of statistical significance were established at $p < 0.05$.

Results

Effects of apixaban on thrombus formed under flow conditions

We assessed the effects of apixaban concentrations on platelet and fibrin components of thrombus formed in studies under flow conditions. As summarized in [Fig 1A and 1B](#), apixaban at elevated concentrations (160 ng/mL) demonstrated a powerful inhibitory action on fibrin formation with a moderate reduction in platelet deposition with differences reaching values of statistical significance ($p < 0.01$ vs. baseline values). Inhibitory effects on fibrin formation were not observed with the lower concentrations of apixaban tested (10 and 40 ng/mL) ([Fig 1B](#)).

A more detailed analysis of the characteristic of the platelet aggregates formed on the thrombogenic vessel surface revealed that apixaban interfered with the formation of larger platelet aggregates (≥ 5 microns in height) in a dose-dependent manner ([Fig 1C](#)). As shown in the bar diagrams, reduction in the proportion of larger aggregates resulted in a tendency to associate platelets into smaller platelet aggregates (< 5 microns in height). Apixaban at 160 ng/mL not only reduced the total surface covered by platelets, but also caused significant reductions in the formation of larger platelet aggregates ($14.6 \pm 1.9\%$ vs. $28.4 \pm 2.9\%$ in controls; $p < 0.01$). A similar tendency was observed with 40 ng/mL with an inferior but statistically significant reduction ($p < 0.05$). The lower concentration of apixaban tested (10 ng/mL) did not significantly affect the formation or size of platelet aggregates. Results are summarized in [Table 1](#).

Effects of apixaban on thromboelastometry parameters

We also investigated modifications by apixaban in viscoelastic properties of forming clots. As shown in [Fig 2](#), apixaban induced a dose-dependent alteration in the thromboelastometry parameters measured.

Exposure of human blood to 10, 40 or 160 ng/mL was followed by a progressive delay in the kinetics of clot formation, with prolongations of clotting related parameters (CT and CFT). These prolongations reached levels of statistical significance for concentrations of apixaban ≥ 40 ng/mL. Similar tendencies were observed for CFT. Evaluation of changes in the clot firmness showed a tendency to reduced clot firmness at 10 min (A10) with increasing concentrations of apixaban, but differences never reached levels of statistical significance. More detailed data is offered in [Table 2](#).

Impact of apixaban on thrombin generation primed by platelets

Contribution of platelets to local thrombin generation was investigated in a modified cell-based model of thrombin generation primed by platelets. Representative thrombin generation profiles are shown in [Fig 3](#). Normal values for the lag phase in experiments in the absence of

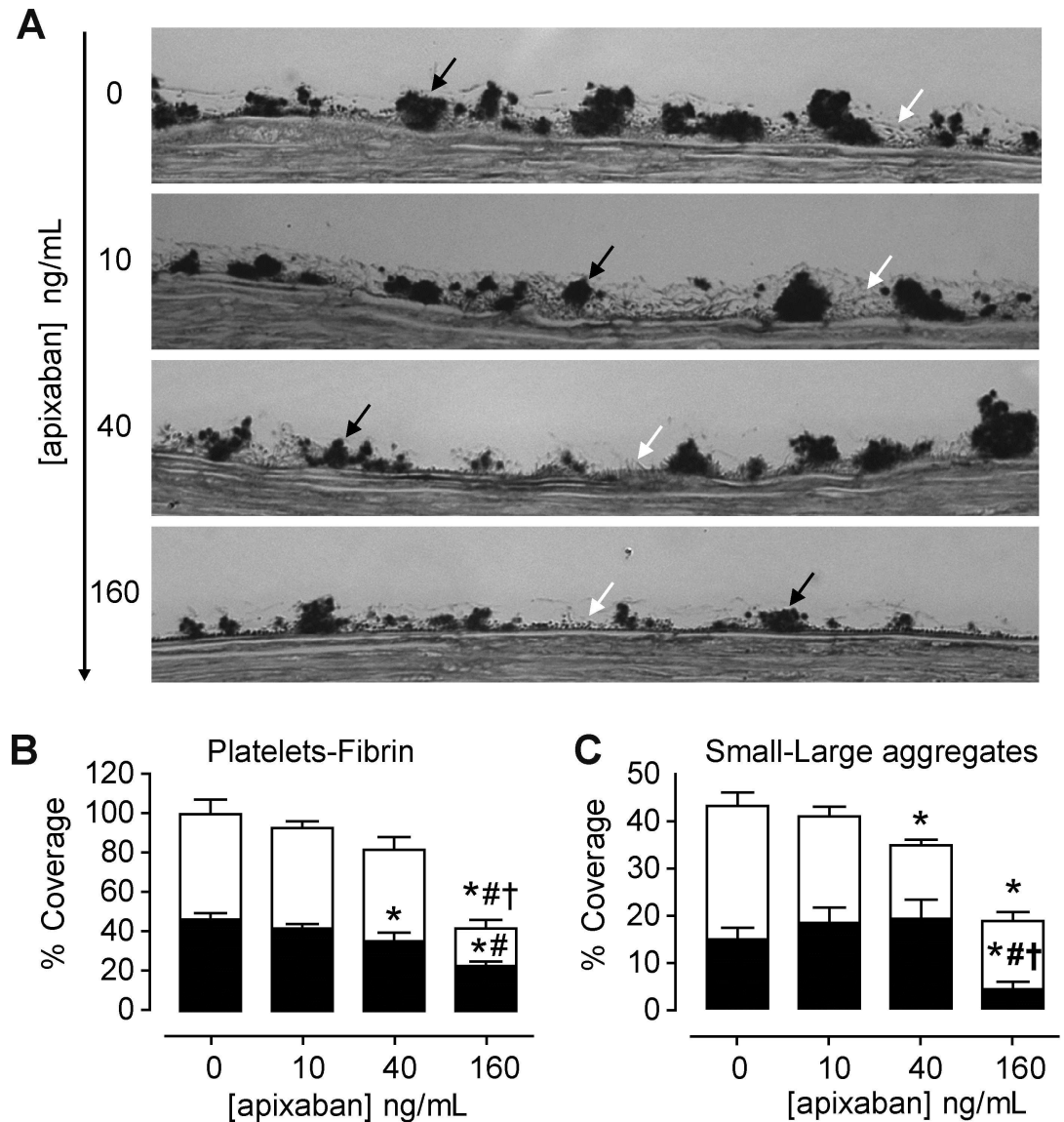


Fig 1. Effects of apixaban on platelet and fibrin interactions with damaged vessels exposed to flowing blood. At the highest concentration, apixaban significantly inhibited the incorporation of fibrin and platelets into the forming thrombi. Inhibitory effects on fibrin formation were not observed with apixaban at 40 or 10 ng/mL. Antiplatelet effects of apixaban were still evident at 40 ng/mL. (A) Representative micrographs showing platelets and fibrin interactions on cross-sections of the perfused vessels. Citrated blood previously incubated with different concentrations of apixaban (0, 10, 40 and 160 ng/mL) was recalcified and immediately perfused at a shear rate of 800 s^{-1} , for 5 min. Black arrows point to platelet aggregates and white arrows indicate fibrin (Magnification $\times 1000$). (B) Bar diagrams represent results of morphometric evaluations in cross-sections of perfused vessels, showing percentage of surface covered by platelets aggregates (black) or fibrin (white). (C) Bar diagrams represent presence of small (< 5 microns height; black) and large (> 5 microns height; white) platelet aggregates. Results are expressed as Mean \pm S.E.M ($n = 5$). * $p < 0.01$ vs. baseline (no apixaban); # $p < 0.01$ vs. apixaban 10 ng/mL and † $p < 0.01$ vs. apixaban 40 ng/mL.

doi:10.1371/journal.pone.0171486.g001

apixaban were 7.0 ± 0.8 min, with a maximum peak of thrombin equivalent to 79.1 ± 4.9 nM, reached at 21.8 ± 3.1 min.

Apixaban showed a clear dose effect relationship in the kinetics of thrombin generation, with progressive delays in both the time to start thrombin generation (lag time), which was doubled and maintained with all the apixaban concentrations tested (lag times ranging from

Table 1. Modifications on percentages of platelet and fibrin coverage, by increasing concentrations of apixaban, in studies with flowing blood.

[Apixaban] ng/mL	Percentage of surface coverage (%)			
	Platelets	Fibrin	Large Agg.	Small Agg.
0	46.6 ± 3.5	53.8 ± 7.4	28.4 ± 2.9	14.6 ± 2.6
10	42.1 ± 2.5	51.2 ± 3.5	22.7 ± 2.0	18.1 ± 3.4
40	35.5 ± 4.8 *	46.9 ± 6.3	15.71 ± 1.3 *†	19.0 ± 4.3
160	21.0 ± 2.8 *†§	19.3 ± 4.4 *†§	14.6 ± 1.9*†	4.0 ± 1.8*†§

Large Agg.: Large platelet aggregates of > 5 microns in height

Small Agg.: Small platelet aggregates of <5 microns in height

Results are expressed as Mean ± SEM (n = 5)

* p<0.01 vs. apixaban 0 ng/mL

† p<0.01 vs. apixaban 10 ng/mL

§ p<0.05 vs. apixaban 40 ng/mL

doi:10.1371/journal.pone.0171486.t001

13 min to 13.4 min), and the time to reach the maximum peak of thrombin, which was prolonged in a dose-dependent manner (37.1 ± 1.9 min, 57.8 ± 8.8 min and 72.5 ± 6.2 min, respectively with apixaban 10, 40 and 160 ng/mL). These reductions reached statistical significance with all the apixaban concentrations investigated vs. control experiments ($p < 0.01$). Moreover, the maximum peak of thrombin generated was reduced proportionally to the dose of apixaban (60.9 ± 1.0 nM, 55.7 ± 3.5 nM and 36.7 ± 3.1 nM, respectively with apixaban 10, 40 and

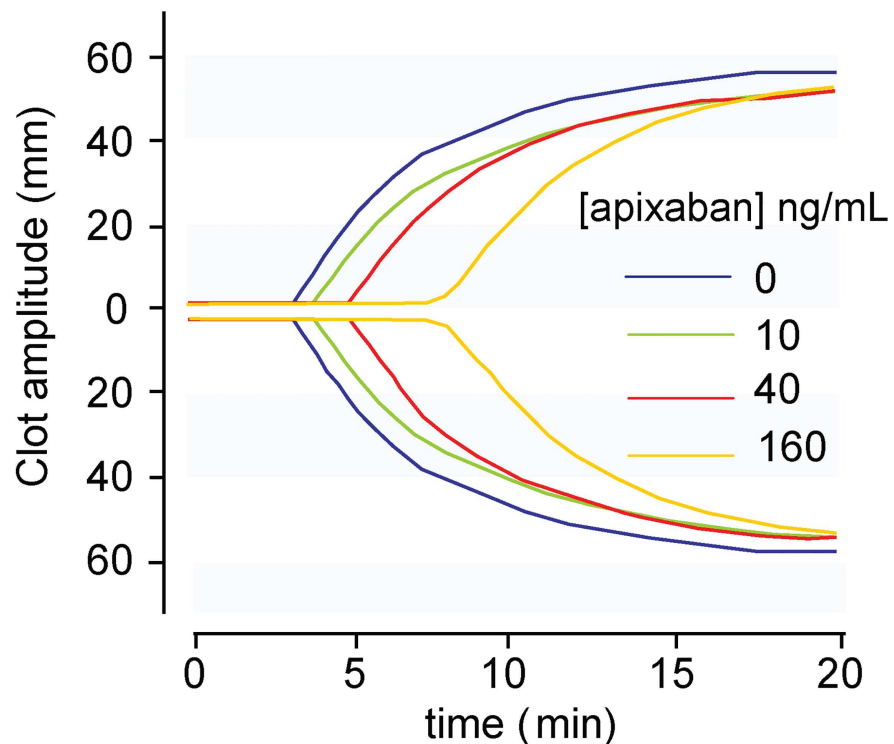


Fig 2. Modifications in thromboelastometry profiles of whole blood by apixaban at low and high concentrations. Assays were triggered by tissue factor-rich phospholipid micelles and calcium. Results reveal a dose-dependent action of apixaban (10, 40 and 160 ng/mL) on the kinetics of clot formation and clot firmness. Clotting times were progressively delayed by apixaban. Effects on clot firmness were less evident.

doi:10.1371/journal.pone.0171486.g002

Table 2. Modifications in thromboelastometry parameters by apixaban triggered by tissue factor rich phospholipid micelles and calcium.

apixaban (ng/mL)	CT (min)	CFT (min)	A10 (mm)
0	211.7 ± 13.3	95.7 ± 8.8	53.2 ± 2.3
10	247.8 ± 44.3	109.6 ± 9.1	52.4 ± 2.3
40	289.2 ± 48.6 #	129.2 ± 16.4	49.0 ± 2.9
160	367.7 ± 30.6 *#	141.0 ± 9.9 *#	47.7 ± 2.4

Apixaban delayed kinetics of clot formation, measured as clotting time (CT) and clot formation time (CFT); and reduced clot firmness after 10 minutes (A10). Results are expressed as Mean ± S.E.M (n = 5 to 6 for apix 0 and 160 ng/mL).

* p<0.05 vs. apixaban 0 ng/mL and

p<0.05 vs. apixaban 10 ng/mL

doi:10.1371/journal.pone.0171486.t002

160 ng/mL), reaching statistically significant inhibitions with all the concentrations of apixaban when compared to control studies performed in the absence of this anticoagulant (p<0.01). Thrombin peak and area under the curve (A.U.C.) reached with 160 ng/mL of apixaban were significantly reduced with the respective results observed for concentrations of 10 or 40 ng/mL (p<0.01). For more detailed results, including those in experiments with vehicle, refer to [Table 3](#) and [S1 Table](#), respectively.

Discussion

Apixaban showed variable antithrombotic actions in the different experimental approaches investigated. In flow studies in a thrombosis model with blood circulating at arterial shear

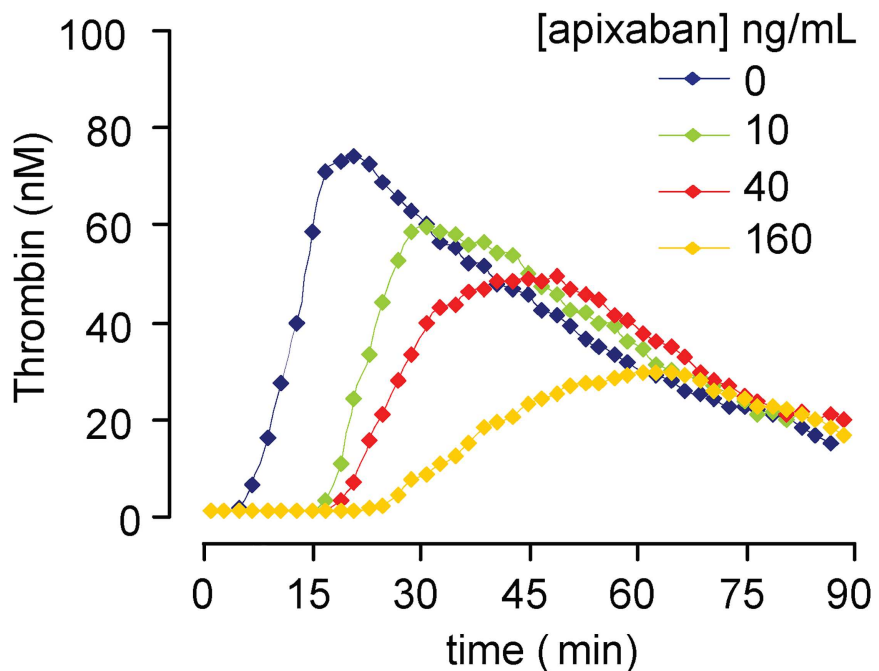


Fig 3. Impact of apixaban in a platelet-primed model of thrombin generation. Representative thrombin generation profiles showing the impact of different doses of apixaban in the contribution of platelets to local thrombin generation primed by platelets, triggered by tissue factor rich phospholipids-micelles and calcium. Apixaban caused dose-dependent prolongations in the initiation of thrombin generation with a parallel reduction in the thrombin peak and the total amount of thrombin generated. This assay detected alterations in the kinetics of thrombin generation and total amount of thrombin generated, even with the lowest concentrations of apixaban tested (10 and 40 ng/mL).

doi:10.1371/journal.pone.0171486.g003

Table 3. Modifications on thrombin generation parameters induced by increasing concentrations of apixaban in platelet-enriched samples.

[Apixaban] ng/mL	Lag Phase (min)	Thrombin Peak		Area Under Curve A.U.C.
		Time (min)	Peak (nM)	
0	7.0 ± 0.8	21.8 ± 3.1	79.1 ± 4.9	3156.8 ± 96.5
10	13.0 ± 0.5 *	37.1 ± 1.9 *	60.9 ± 1.0 *	2664.2 ± 87.2 *
40	13.4 ± 1.4 *	57.8 ± 8.8 *	55.7 ± 3.5 *	2447.3 ± 178.0 *
160	13.4 ± 0.9 *	72.5 ± 6.2 *†	36.7 ± 3.1 *†§	1421.8 ± 234.1 *†§

Results are expressed as Mean ± SEM (n = 5)

* p<0.01 vs. apixaban 0 ng/mL

† p<0.01 vs. apixaban 10 ng/mL

§ p<0.05 vs. apixaban 40 ng/mL

doi:10.1371/journal.pone.0171486.t003

rates, apixaban concentrations equivalent to the C_{max} achieved in patients receiving treatment for the prophylaxis of thrombotic complications, significantly reduced fibrin generation and platelet aggregate formation. These effects on platelets and fibrin formation were not observed with the lower concentrations of apixaban tested. In contrast with the previous observations, concentrations 4 to 16 times below the usual antithrombotic C_{max} did still show significant inhibitory action in the contribution of platelets to thrombin generation in studies under more static conditions. A combination of studies with flowing blood and thrombin generation in a platelet-rich environment could be useful to differentiate concentrations of anticoagulants that inhibit platelet-mediated thrombin formation from those that deeply impair fibrin formation necessary for consolidation of hemostasis.

Our present studies demonstrate a differential impact of high vs. low concentrations of apixaban on platelet and coagulation components of thrombus formation in studies under flow conditions. Previous studies from our group demonstrated that apixaban at a concentration compatible with the C_{max} reached in patients subjected to treatment for the prophylaxis of thrombotic complications [18,19,21,24], dramatically reduce fibrin incorporation into forming thrombi in a similar thrombosis model with human blood circulated at moderated shear rates. Our present results with apixaban at 160 ng/mL indicate that, in addition to its powerful inhibitory action on fibrin formation, apixaban interfered with the formation of large platelet aggregates causing statistically significant reductions in their size. Interestingly, the lower concentrations of apixaban (40 or 10 ng/mL) did not cause significant quantitative modifications in fibrin deposition, though they still showed some antiplatelet effects under dynamic flow conditions. Therefore our results support the concept that low concentrations of apixaban inhibit platelet-mediated thrombin generation that could facilitate the formation of platelet-rich occlusive thrombi.

Blood flow conditions play a critical role in the pathophysiology of venous and arterial thrombotic complications [25]. Venous and intracardiac thrombi are generated under relatively low-shear environments that favor the activation of the coagulation mechanisms, thus generating fibrin-rich thrombi. In contrast, platelet adhesion and aggregation play a predominant role at the elevated shear rates that occur in arterial regions resulting in rapidly developing thrombi that contribute to the ischemic complications in ACS [26,27]. Flow conditions are subjected to extreme variations during the formation of an occlusive thrombi shifting from extremely elevated shear rates at the apex of a growing thrombi, to reduced shears related to deceleration of blood flow at the base of the thrombi, or to almost stagnant conditions in the distal area where the thrombi is being formed [28,29]. Under these circumstances, platelets circulating close to the vessel wall interact with aggregated platelets already deposited on a

damaged atherosclerotic plaque, being further activated by thrombin locally generated, and favoring thrombus propagation [9]. Our experimental design wanted to reproduce this scenario by evaluating the contribution of platelets to thrombin generation in a modified version of the cell-based model of coagulation in the presence of elevated number of platelets, tissue factor and diluted plasma [30]. Our results in this thrombin generation assay primed by platelets differ from those in the studies with flowing blood. While the inhibition of thrombin generation followed a dose-effect relationship with the concentration of apixaban in the thrombin generation assay, the inhibition of fibrin formation and platelet deposition was only observed with the most elevated concentration of apixaban in studies with circulating blood. These findings confirm that concentrations of apixaban required to inhibit fibrin formation under flow conditions are much higher than those necessary to significantly inhibit thrombin generation in a platelet rich environment.

Thrombin locally generated plays a critical role in the composition and structure of hemostatic and occlusive clots through the activation of platelets and generation of a fibrin net that will consolidate growing thrombi. In hemostatic clots, fibrin stabilizes the initial platelet-rich plug to control bleeding through an injured vessel [31]. Fibrin formation also contributes to the formation of pathologic clots under elevated arterial shear rates leading to an increase in platelet presence and a low porosity fibrin packing that limits the diffusion of thrombin [16]. At the early stages of formation of pathologic arterial clots thrombin generated is rapidly removed by the bloodstream leaving only thrombin generated at the core to activate and recruit additional platelets [32]. As the thrombus becomes more occlusive, thrombin generated incorporates more fibrin and platelets, making it more resistant and reducing its porosity [28,29]. Inhibition of local thrombin generated at the level of a platelet thrombus consolidating on a ruptured plaque, should prevent the feedback of thrombin generated promoting the activation of further circulating platelets and the association of fibrin and VWF to the forming thrombus. Our data indicate that the lower concentrations of apixaban tested in our studies may interfere with this feedback mechanism, and still preserve the formation of hemostatic fibrin clots.

In our studies, apixaban delayed kinetic thromboelastometry parameters, but seemed to have minimal impact on the structural properties of the formed clots. The prolongation of clotting times with the increasing doses of apixaban paralleled the reductions measured in thrombin generation kinetics. In contrast, apixaban as other DOACs did not modify in a significant way the maximum clot firmness of clots formed in the ROTEM system [21,33]. Our thromboelastometry studies reflect the antithrombotic action of apixaban in hemostatic and venous clots as a prolongation of clotting times related to a reduced and delayed generation of thrombin. However, the composition of clots generated under the low shear conditions produced in thromboelastometry would be completely different from the platelet-rich occlusive thrombi generated in ruptured atherosclerotic plaques. It is likely that thromboelastometry results do not bring additional information on the structure and clot resistance of clots forming at elevated shear rates.

Results of our present studies may have clinical implications. Combined inhibition of fibrin formation and platelet aggregation caused by DOACs may interfere with hemostasis and result in increased bleeding. Actually, an enhancement of the antithrombotic action of rivaroxaban with single or dual antiplatelet therapy has been demonstrated in a porcine model of stent thrombosis [34]. The APPRAISE-2 trial investigated the concomitant beneficial effect of apixaban and standard antiplatelet therapy in ACS; however, the dose of 5 mg twice daily (BID), equivalent to the full anticoagulant dose recommended for SPAF revealed unsatisfactory outcomes [35]. This clinical trial was prematurely terminated due to an increase in major bleeding events with apixaban in the absence of a counterbalancing reduction in recurrent ischemic

events. Interestingly, in the phase III study ATLAS ACS 2 TIMI 51 patients with a recent ACS were randomized to rivaroxaban 2.5 mg BID or 5 mg BID or placebo, in addition to standard antiplatelet therapy [36]. In the mentioned study, rivaroxaban -at doses one fourth to one half of those indicated for the prevention or treatment of venous or AF-related thrombosis-reduced the risk of the composite end-point of death from cardiovascular causes, myocardial infarction, or stroke in patient with recent acute coronary syndromes. Moreover, evidence from a recent clinical trial confirms the efficacy and safety of the 2.5 mg rivaroxaban dose (2.5 mg BID in patients with atrial fibrillation undergoing intracoronary stenting, receiving dual antiplatelet therapy [37]

It is quite possible that the selection of doses of apixaban for the prevention on thrombotic complications in arterial territories was based on those established for other antithrombotic indications and did not consider the antihemostatic action of the elevated doses of apixaban at elevated shear rates. Our data indicate that lower concentrations of apixaban may interfere with thrombin generation in a platelet rich environment, but still preserve the contribution of fibrin to the preservation of its hemostatic function.

Conclusion

In the present study, apixaban at 10, 40 and 160 ng/mL differently inhibited local thrombin generation, altered coagulation parameters during the clot formation, and reduced platelet and fibrin deposition on damaged vessels in studies with circulating blood. Our data indicate that apixaban at doses one fifth to one half of that indicated for the prevention or AF-related thrombosis, could be adequate to reduce thrombin generation, the formation of large platelet aggregates and still allow fibrin formation, thus preserving its contribution to hemostasis. Studies in modified thrombin generation assays primed by platelets could be useful to investigate the antithrombotic action of DOACs in the prevention of atherothrombotic complications in arterial territories. Moreover, experimental studies under flow conditions combined with modified thrombin generation assays would facilitate the selection of DOAC concentration that prevents thrombin-related recruitment of platelets in pathological arterial thrombi, reducing the risk of interfering with fibrin formation necessary for the consolidation of hemostasis.

Supporting information

S1 Supporting information. Thrombin generation in a cell-based model primed by platelets vs. vehicle.

(DOCX)

S1 Table. Parameters of thrombin generation primed by platelets vs. vehicle.

(DOC)

Acknowledgments

ILV, EAR, JCR, MDR and GE belong to the quality research group 2014-SGR-296 recognized by the Catalonia government.

Author Contributions

Conceptualization: MDR GE.

Data curation: LPM ILV GE.

Formal analysis: LPM ILV EAR MDR GE.

Funding acquisition: GE.

Investigation: LPM ILV GE.

Methodology: LPM ILV GE.

Project administration: ILV.

Resources: EAR JCR ALF MDR GE.

Supervision: MDR GE.

Validation: JCR ALF JJB MDR.

Visualization: LPM ILV EAR JJB GE.

Writing – original draft: LPM ILV EAR GE.

Writing – review & editing: LPM ILV JCR ALF MDR JJB GE.

References

1. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Eng J Med*. 1992; 326: 242–250.
2. Lopez-Vilchez I, Tonda R., Hernandez RM, Navalon F, Diaz-Ricart M, Galan AM, et al. Relative contributions of collagen and tissue factor to thrombus formation on damaged vascular vessels: in-vitro studies with circulating blood. *Coron Artery Dis*. 2009; 20: 392–399. doi: [10.1097/MCA.0b013e32832cfff1f](https://doi.org/10.1097/MCA.0b013e32832cfff1f) PMID: [19561489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19561489/)
3. Stalker TJ, Welsh JD, Tomaiuolo M, Wu J, Colace TV, Diamond SL, et al. A systems approach to hemostasis: Thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity. *Blood*. 2014; 124: 1824–1831. doi: [10.1182/blood-2014-01-550319](https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550319) PMID: [24951426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24951426/)
4. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation factor-IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles—a flow cytometric study. *Thromb Haemost*. 1992; 68: 74–78. PMID: [1514177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1514177/)
5. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001; 85: 958–965. PMID: [11434702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11434702/)
6. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32: 32–38.
7. Turpie AG, Chin BS, Lip GY. Venous thromboembolism: pathophysiology, clinical features, and prevention. *BMJ*. 2002; 325: 887–890. PMID: [12386044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12386044/)
8. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 937–954. doi: [10.1016/j.jacc.2005.03.074](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.074) PMID: [16168274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168274/)
9. Turitto VT, Hall CL. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thromb Res*. 1998; 92: S25–S31. PMID: [9886907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886907/)
10. Goldsmith HL, Bell DN, Spain S, McIntosh FA. Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood. *Biorheology*. 1999; 36: 461–468. PMID: [10818647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10818647/)
11. Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report—Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1986; 55: 415–435. PMID: [3750272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3750272/)
12. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014; 276: 618–632. doi: [10.1111/joim.12296](https://doi.org/10.1111/joim.12296) PMID: [25156650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25156650/)
13. Lowe GD. Rheological influences on thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999; 12: 435–449. PMID: [10856980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10856980/)
14. Lowe GD, Rumley A, Whincup PH, Danesh J. Hemostatic and rheological variables and risk of cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*. 2002; 2: 429–439. doi: [10.1055/s-2002-36771](https://doi.org/10.1055/s-2002-36771) PMID: [16222632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222632/)
15. Tomaiuolo M, Stalker TJ, Welsh JD, Diamond SL, Sinno T, Brass LF. A systems approach to hemostasis: Computational analysis of molecular transport in the thrombus microenvironment. *Blood*. 2014; 124: 1816–1823. doi: [10.1182/blood-2014-01-550343](https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550343) PMID: [24951425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24951425/)

16. Muthard RW, Welsh JD, Brass LF, Diamond SL. Fibrin, gamma'-fibrinogen, and transclot pressure gradient control hemostatic clot growth during human blood flow over a collagen/tissue factor wound. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 645–654. doi: [10.1161/ATVBAHA.114.305054](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305054) PMID: [25614284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614284/)
17. Carreras ET, Mega JL. Role of oral anticoagulants in patients after an acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 520–524. doi: [10.1161/ATVBAHA.114.303401](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303401) PMID: [25614282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614282/)
18. Bristol-Myers Squibb. ELIQUIS (apixaban)—Product Monograph. 16 Jun 2016; page 32. http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10028126/f/201607/ELIQUIS_PM_184464_16June2016_E_marketed.pdf
19. Frost C, Nepal S, Wang J, Schuster A, Byon W, Boyd RA, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 76: 776–786. doi: [10.1111/bcp.12106](https://doi.org/10.1111/bcp.12106) PMID: [23451769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23451769/)
20. Diaz-Ricart M, Estebanell E, Cases A, Lopez-Pedret J, Castillo R, Ordinas A, et al. Erythropoietin improves signaling through tyrosine phosphorylation in platelets from uremic patients. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 1312–1317. PMID: [10544920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10544920/)
21. Escolar G, Fernandez-Gallego V, Aellano-Rodrigo E, Roquer J, Reverter JC, Sanz VV, et al. Reversal of apixaban induced alterations in hemostasis by different coagulation factor concentrates: significance of studies in vitro with circulating human blood. *PLoS One.* 2013; 8: e78696. doi: [10.1371/journal.pone.0078696](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078696) PMID: [24244342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24244342/)
22. Galan AM, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, Navalon F, Gomez E, Gasto C, et al. Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 511–519. doi: [10.1160/TH08-12-0810](https://doi.org/10.1160/TH08-12-0810) PMID: [19718472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19718472/)
23. Caballo C, Escolar G, Diaz-Ricart M, Lopez-Vilchez I, Lozano M, Cid J, et al. Impact of experimental haemodilution on platelet function, thrombin generation and clot firmness: effects of different coagulation factor concentrates. *Blood Transfus.* 2013; 11: 391–399. doi: [10.2450/2012.0034-12](https://doi.org/10.2450/2012.0034-12) PMID: [23058866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23058866/)
24. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, et al. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single-dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 75: 476–487.
25. Turpie AGG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis—pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2011; 105: 586–596. doi: [10.1160/TH10-10-0683](https://doi.org/10.1160/TH10-10-0683) PMID: [21225099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21225099/)
26. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 937–954. doi: [10.1016/j.jacc.2005.03.074](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.074) PMID: [16168274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168274/)
27. Turpie AGG, Fisher WD, Bauer KA, Kwong LM, Irwin MW, Kälebo P, et al. BAY 59–7939: an oral, direct Factor Xa inhibitor for the prevention of venous thromboembolism in patients after total knee replacement. A phase II dose-ranging study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2479–2486. doi: [10.1111/j.1538-7836.2005.01602.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01602.x) PMID: [16241946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16241946/)
28. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009; 7 Suppl 1: 17–20.
29. Nesbitt WS, Mangin P, Salem HH, Jackson SP. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med.* 2006; 84: 989–995. doi: [10.1007/s00109-006-0101-1](https://doi.org/10.1007/s00109-006-0101-1) PMID: [17013658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17013658/)
30. Hoffman M, Volovyk Z, Monroe DM. Reversal of dabigatran effects in models of thrombin generation and hemostasis by factor VIIa and prothrombin complex concentrate. *Anesthesiology.* 2015; 122: 353–362. doi: [10.1097/ALN.0000000000000540](https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000540) PMID: [25502064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25502064/)
31. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood.* 2013; 121: 1875–1885. doi: [10.1182/blood-2012-09-457739](https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457739) PMID: [23303817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303817/)
32. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz D, Fernandezortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997; 95: 594–599. PMID: [9024145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9024145/)
33. Arellano-Rodrigo E, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Molina P, Reverter JC, Carne X, et al. Coagulation Factor Concentrates Fail to Restore Alterations in Fibrin Formation Caused by Rivaroxaban or Dabigatran in Studies With Flowing Blood From Treated Healthy Volunteers. *Transfus Med Rev.* 2015; 29: 242–249. doi: [10.1016/j.tmr.2015.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tmr.2015.08.001) PMID: [26364029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26364029/)
34. Becker EM, Perzborn E, Klipp A, Lucker C, Butehorn U, Kast R, et al. Effects of rivaroxaban, acetylsalicylic acid and clopidogrel as monotherapy and in combination in a porcine model of stent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 2470–2480. doi: [10.1111/jth.12033](https://doi.org/10.1111/jth.12033) PMID: [23083002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23083002/)
35. Alexander JH, Becker RC, Bhatt DL, Cools F, Crea F, Dellborg M, et al. Apixaban, an oral, direct, selective factor Xa inhibitor, in combination with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: results of

- the Apixaban for Prevention of Acute Ischemic and Safety Events (APPRAISE) trial. *Circulation*. 2009; 119: 2877–2885. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832139](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832139) PMID: [19470889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19470889/)
36. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012; 366: 9–19. doi: [10.1056/NEJMoa1112277](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112277) PMID: [22077192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22077192/)
 37. Gibson CM, Pinto DS, Chi G, Arbeter D, Yee M, Mehran R, et al. Recurrent Hospitalization Among Patients With Atrial Fibrillation Undergoing Intracoronary Stenting Treated With 2 Treatment Strategies of Rivaroxaban or a Dose-Adjusted Oral Vitamin K Antagonist Treatment Strategy. *Circulation*. 2016; <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025783>

Supporting information

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171486.s001>

S1 Supporting Information. Thrombin generation in a cell-based model primed by platelets vs. vehicle. To emphasize the contribution of platelets to thrombin generating in the arterial vessels we adapted a fluorimetric assay of thrombin generation and established the optimal conditions: platelets ($1 \times 10^6/\mu\text{L}$), which contribute to the process with anionic phospholipids and released factors from the granules after activation; and 7.5% plasma, which provides coagulation factors enough to initiate and maintain the thrombin generation. These samples were incubated for 30 min with apixaban. The reaction of thrombin generation assay was initiated with a preparation of tissue factor (1.1 pM), calcium and fluorogenic substrate (Technothrombin). Generated fluorescence was recorded for 90 min (λ ex/em: 390/450 nm). Concentrations of platelet and plasma previously assessed showed the most reliable results to study inhibition of thrombin generation by apixaban in the presence of an elevated concentration of platelets to ($1 \times 10^6/\mu\text{L}$). Thrombin generation was extremely reduced in experiments with 7.5% of plasma, in the absence of platelets. However, presence of platelets restored and potentiated thrombin generation in this setting. Apixaban showed a clear dose-dependent inhibitory action on thrombin generation primed by platelets, even with the lowest concentration tested (10 ng/mL), approximately 16-fold below the therapeutic C_{max} . Parallel determinations using vehicle (Hanks's balanced salt solution) instead of platelets demonstrated critical delays by apixaban in the dynamic parameters of thrombin generation far exceeding those in the presence of platelets, with minimal amounts of thrombin generated during the assay ranging between 0 nM to 5.78 nM (average 3.8 ± 1.0 nM). For more detail please refer to S1 Table.

S1 Table. Parameters of thrombin generation primed by platelets vs. vehicle.

[Apixaban] ng/mL	platelets + 7.5 % PPP	vehicle + 7.5 % PPP
Lag Phase (min)		
0	7.0 ± 0.8	16.2 ± 2.8
10	13.3 ± 0.5 *	17.8 ± 1.7
40	13.4 ± 1.4 *	23.2 ± 2.0 #
160	13.4 ± 0.9 *	17.6 ± 2.4 #
Thrombin Time (min)		
0	21.8 ± 3.1	42.4 ± 18.1
10	37.1 ± 1.9 *	44.4 ± 19.9
40	57.8 ± 8.8 *	54.4 ± 16.5
160	72.5 ± 6.2 *†	31.2 ± 13.9
Thrombin Peak (nM)		
0	79.1 ± 4.9	3.8 ± 1.0 #
10	60.9 ± 1.0 *	5.6 ± 2.5 #
40	55.7 ± 3.5 *	2.6 ± 1.0 #
160	36.7 ± 3.1 *†§	1.9 ± 0.6 #
Area Under the Curve (A.U.C.)		
0	3156.8 ± 96.5	106.8 ± 51.4 #
10	2664.2 ± 87.2 *	103.6 ± 46.1 #
40	2447.3 ± 178.0 *	26.1 ± 11.7 #
160	1421.8 ± 234.1 *†§	3.5 ± 2.1 #

Rows compare measurements between samples with platelets and vehicle for the same concentration of apixaban. Results expressed as Mean ± SEM (n = 5).

* p<0.01 vs. the corresponding control (platelets / vehicle) with apixaban at 0 ng/mL

† p<0.01 vs. apixaban 10 ng/mL

§ p<0.05 vs. apixaban 40 ng/mL

p<0.05 vs. the same apixaban concentration in platelets + 7.5 % PPP

