



Continguts: <http://www.acclc.cat/volumen/vol-19/>

In vitro veritas

Pàgina web de la revista: <http://www.acclc.cat/invitro/>



Actes - resums

Resum de la cinquena sessió del VI Curs d'actualització en ciències de Laboratori Clínic: "Anticoagulants directes. Visió general i maneig al laboratori"

Noèlia Vilalta

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

2018 © Publicat per l'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

El 21 de març del 2018 va tenir lloc, a la seu del Col·legi Oficial de Farmacèutics de Barcelona, la cinquena sessió del VI Curs d'actualització en ciències de Laboratori Clínic: "Anticoagulants directes: Visió general i maneig al laboratori", impartida per Noèlia Vilalta, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introducció

Hi ha diferents tipus de fàrmacs anticoagulants. Els anticoagulants clàssics (heparina no fraccionada, heparina de baix pes molecular, fondaparinux i antagonistes de la vitamina K) actuen sobre diverses proteïnes plasmàtiques per reduir la generació de trombina. Els anticoagulants directes (d'ara endavant ADs) són una nova generació de fàrmacs anticoagulants que basen el seu mecanisme d'acció en la inhibició directa d'un sol factor de la coagulació: per al factor II, dabigatran i per al factor X, rivaroxaban, apixaban i edoxaban. Aquests nous fàrmacs han demostrat la seva eficàcia en la profilaxi i el tractament dels esdeveniments trombotics venosos i en la prevenció d'embolismes d'origen cardíac en pacients amb fibril·lació auricular (1-4).

Un dels avantatges dels anticoagulants directes és que no precisen de monitoratge continu del seu efecte farmacològic atès que tenen unes característiques farmacocinètiques i farmacodinàmiques similars, posseeixen una finestra terapèutica àmplia i tenen menys interaccions alimentàries i farmacològiques. No obstant això, hi ha determinades situacions en què la determinació de l'activitat anticoagulant pot ser útil: cirurgies urgents, sagnats vitals, sospita de

sobredosi, sospita d'incompliment terapèutic, edat avançada, disfunció hepatorenal o pesos extrems.

Mètodes diagnòstics

Els estudis d'hemostàsia del laboratori habituals, el temps de coagulació induïda per factor tissular en el plasma, «temps de protrombina» (d'ara endavant TP) i el temps de coagulació induïda per una superfície en el plasma, «temps de tromboplastina parcial activada» (TTPa), no són útils per a la correcta monitorització d'aquests fàrmacs per la seva sensibilitat insuficient i l'absència de linealitat dosi-resposta.

Les dues classes d'ADs poden alterar la concentració de diversos factors de la coagulació. L'estudi de trombofilia és particularment insegur en aquest aspecte, ja que els ADs poden augmentar els valors de la concentració de proteïna S i proteïna C emmascarant un possible dèficit d'aquestes o una resistència a la proteïna C activada. També es troben resultats falsos positius en el cas de la determinació de l'anticoagulant lúpic. Els procediments basats en mètodes cromogènics, poden donar resultats falsament elevats quan es tracta de dabigatran i el substrat és la trombina o quan és rivaroxaban, apixaban i edoxaban en substrats del factor Xa (5).

Afortunadament, hi ha magnituds relacionades amb la coagulació que no s'alteren davant la presència d'ADs: temps de reptilasa (TR), la concentració de fibrinogen pel mètode Clauss (amb concentracions de trombina elevades). Tampoc s'alteren els procediments basats en mètodes immunoturbidimètrics (Dímer D, von Willebrand antigènic), mètodes cromogènics no basats en l'activitat del factor II i el factor X (proteïna C i plasminogen), el cofactor de la

ristocetina i els mètodes moleculars. No hi ha estudis sobre la interferència d'aquests fàrmacs en la funció plaquetària (5-8).

Igual que succeeix amb altres fàrmacs, de forma òptima la monitorització dels ADs es basa en la determinació de la concentració del fàrmac en el plasma.

El procediment basat en la cromatografia líquida amb espectrometria de masses (CL-EM) és la referència per al mesurament de la concentració plasmàtica dels ADs. A diferència dels procediments habituals, la CL-EM no té interferències amb altres factors de la coagulació, altres anticoagulants ni depèn tant de la fase preanalítica (9).

No obstant això, no és un procediment exempt de problemes: el processament és llarg la qual cosa no el fa adequat per urgències, precisa d'instrumentació cara i sofisticada i d'un personal format. Aquestes característiques limiten el seu ús al camp de la investigació (10).

A més del mètode, cal considerar altres aspectes com el temps que ha transcorregut des de la presa del fàrmac fins a l'extracció de la mostra. Els ADs solen aconseguir la concentració màxima (C_{max}) entre les 2 i les 4 hores després de la presa. Avaluar la C_{max} és útil davant de casos de trombosi en un pacient en tractament anticoagulant i, d'altra banda, la determinació en el moment de la concentració mínima (C_{min}) ajuda a la interpretació en casos de sagnat (6).

Monitorització dels inhibidors directes de la trombina

Dabigatran és el primer inhibidor directe de la trombina aprovat per a la prevenció d'esdeveniments tromboembòlics en pacients amb fibril·lació auricular i en pacients sotmesos a cirurgia de substitució total de maluc i genoll. També té indicació pel tractament de la trombosi venosa profunda (TVP) i de l'embòlia pulmonar (EP) i en la prevenció de recurrències d'aquestes dues (1). Després de la seva administració via oral, és ràpidament hidrolitzat *in vivo* al seu metabòlit actiu. El seu efecte és ràpid, arribant al pic màxim de concentració i activitat a les 2 - 3 hores. Diferents estudis mostren una relació estreta entre la concentració en el plasma de dabigatran i el seu efecte anticoagulant. Atès que actua sobre la trombina inhibint el pas de fibrinogen a fibrina, totes les magnituds bàsiques relacionades amb la coagulació es poden veure afectades (11, 12).

Diferents estudis han demostrat una relació lineal entre la concentració del fàrmac en el plasma i la ràtio de TTPa. A concentracions de massa superiors a 200 ng/mL s'arriba a un replà (*plateau*) impeding un mesurament de la concentració precís. Els resultats varien segons l'analitzador i el reactiu utilitzat. Les diferents respostes dels reactius de TTPa a dabigatran impedeixen que es pugui establir un interval de TTPa a partir del qual es els resultats corresponguin a concentracions supraterapèutiques del fàrmac (11, 19).

El TP és una magnitud que varia menys que el TTPa. Dabigatran té un efecte mínim sobre el TP. La variabilitat amb els diferents reactius és superior a la dels reactius utilitzats per al TTPa per la qual cosa no és adequat per monitoritzar l'efecte anticoagulant de dabigatran (11, 12).

D'altra banda, el temps de coagulació induïda per la trombina en el plasma, «temps de trombina» (TT), no és útil per monitoritzar el seu efecte o mesurar la seva concentració en el plasma al ser una magnitud extremadament variable. Sí que és

útil com a magnitud d'exclusió: Un TT dintre de l'interval de referència suggereix una concentració mínima o absència de dabigatran a la mostra (11,12).

La presència de dabigatran en una mostra pot infraestimar el mesurament de la concentració del fibrinogen mitjançant el mètode Clauss, sobretot, quan s'utilitzen baixes concentracions de trombina. La determinació del fibrinogen no s'interfereix quan les concentracions de trombina són elevades (5).

Per estimar la concentració en el plasma de dabigatran, hi ha dos mètodes: la determinació del TT en plasma prediluint, reactiu comercial *Hemoclot thrombin inhibitor* (HTI), o mitjançant mètodes cromogènics o coagulomètrics amb el temps de coagulació induïda per ecarina en el plasma (ECT).

L'HTI és un procediment similar al TT en el qual el plasma del pacient es dilueix amb clorur sòdic fins a una concentració d'entre 1:8 a 1:20. La mostra s'incuba amb plasma que té les magnituds relacionades amb la coagulació dintre de l'interval de referència abans d'afegir trombina-alfa purificada. La dilució del plasma disminueix la resposta exagerada del TT estàndard. Es tracta d'un procediment sensible i reproducible per al mesurament de la concentració de dabigatran i manté una relació lineal excel·lent entre els ventalls infra, supraterapèutics i terapèutics (5, 11, 12).

L'ECT és un procediment específic per determinar la generació de trombina. S'afegeix a la mostra verí de serp que transforma la protrombina a meizotrombina, que, al seu torn, transforma el fibrinogen en fibrina (mètode coagulomètric) o hidrolitza un substrat peptídic unit a un cromòfor (mètode cromogènic). La meizotrombina és inhibida pels inhibidors de la trombina (IDT). Comparant els resultats del plasma del pacient amb un estàndard de calibratge pel fàrmac, s'observa una correlació lineal entre la concentració en el plasma de dabigatran i la prolongació de l'ECT (5).

L'ECT s'ha emprat sobretot en l'àmbit de la recerca. S'han desenvolupat equips de reactius comercials però no estan validats ni estandarditzats pel dabigatran, ja que s'ha observat una gran variabilitat interserial (8,12).

Monitorització dels inhibidors directes del factor X activat

Rivaroxaban va ser el primer inhibidor directe del Factor X activat comercialitzat. El seu efecte no només es basa en la inhibició del Factor Xa lliure sinó que també inhibeix el que forma part del complex protrombinasa i el present al coàgul (6). Apixaban ha estat autoritzat a la Unió Europea des de maig del 2011 i, edoxaban, ha estat l'últim inhibidor desenvolupat. Tots tres tenen indicació per a la profilaxi del tromboembolisme venós en pacients sotmesos a cirurgia de substitució total de maluc i genoll, per a la prevenció de l'íctus en pacients amb fibril·lació auricular i per al tractament i la prevenció de recurrències de la TVP i l'EP (1).

S'ha observat una relació concentració-depenent entre rivaroxaban i TTPa mentre que amb apixaban, aquesta és menor. Aquesta relació és curvilínia suggerint que l'afinitat disminueix a mesura que augmenta la concentració del fàrmac (6). Un TTPa dintre dels valors de referència no exclou la presència de cap dels dos anticoagulants (15). Cal considerar que aquesta sensibilitat depèn del reactiu utilitzat.

Amb edoxaban l'experiència és menor. També s'ha observat que prolonga el TTPa de forma dosi-depenent tant en estudis *in vivo* com *in vitro* però la correlació entre el TTPa i la concentració en el plasma d'edoxaban és modesta (R^2 entre 0,4 i 0,89). Es requereixen concentracions de massa supraterapèutiques de 500 ng/mL (les concentracions habituals en pacients tractats amb edoxaban 60 mg al dia són entre 120-250 ng/mL) per duplicar el TTPa (16).

El TP és més sensible davant la presència de rivaroxaban que d'apixaban, encara que també depèn dels reactius utilitzats. Concentracions terapèutiques d'apixaban freqüentment no alteren el TP (7). Igual que passa amb el TTPa, un TP dins l'interval de referència, no exclou la presència dels fàrmacs en la mostra (15). El TP davant edoxaban mostra una relació lineal entre les concentracions del fàrmac i la prolongació del temps. La correlació segueix sent modesta però superior que amb el TTPa: R^2 entre 0,79 i 0,96. S'han observat (en tots els fàrmacs) diferències segons la tromboplastina utilitzada. La correcció de la ràtio de PT utilitzant l'ISI (acrònim de l'anglès *international sensitivity index*) tampoc redueix la variabilitat entre reactius (7, 14, 16, 17).

El TT, el TR i la concentració del fibrinogen habitualment no es troben alterats. El TT pot arribar a prolongar-se en concentracions supraterapèutiques però no amb les dosis utilitzades habitualment (16).

Els mètodes per mesurar la concentració d'inhibidors del factor X activat (anti-Xa) cromogènics o coagulatius s'utilitzen per determinar la presència en plasma d'inhibidors directes del factor X activat. Serveixen específicament per a l'estimació de la concentració de fàrmac (utilitzant uns calibradors concrets) i per valorar la seva activitat. Hi ha una correlació lineal entre la concentració del fàrmac i el grau d'inhibició observat. Encara que proporcionen informació sobre l'activitat anticoagulant dels ADs, cal tenir en compte que són vulnerables a diferents variables: concentracions supra i infraterapèutiques dels fàrmacs, coagulopaties, concentracions elevades de factor VIII, presència de l'anticoagulant lúpic, presència d'heparina a la mostra o variació entre sistemes de mesura (6). Així mateix, en general, els procediments específics de monitorització anti-Xa mostren una bona correlació amb la concentració del fàrmac.

En el cas d'edoxaban, l'activitat anti-Xa mostra una adequada linealitat i correlació ($R^2 > 0,95$) entre la concentració plasmàtica i l'efecte anti-Xa. A la majoria d'estudis s'han utilitzat els calibradors estàndards per heparina de baix pes molecular (HBPM). Segurament, l'ús de calibradors específics milloraria la linealitat i l'exactitud per mesurar les concentracions d'edoxaban, sobretot en casos de sobredosi (> 200-300 ng/mL) (16, 17).

Conclusions

En l'avaluació de l'efecte dels ADs ens enfrontem a valors supra o infraterapèutics atès que probablement sigui l'hemorràgia o la trombosi una de les situacions en què podria estar justificada la seva avaluació. Cal tenir en compte, a més, aspectes com el temps transcorregut des de l'última dosi, la funció renal i la informació clínica (5).

Dabigatran: per a la seva monitorització, els procediments més útils són l'APTT, DTT, HTI i ECT. Tots mostren una

bona sensibilitat, reproductibilitat i linealitat a excepció de l'APTT que perd la seva linealitat a elevades concentracions. Segons recomanacions recents del comitè d'estandardització de l'ISTH (acrònim de l'anglès *International Society on Thrombosis and Haemostasis*), el TTPa és un procediment útil per monitoritzar l'efecte anticoagulant en situacions d'urgència mentre que el DTT, HTI i ECT són més útils per estimar l'efecte anticoagulant del fàrmac (18, 19).

Rivaroxaban: el TP és útil per a determinar la intensitat de l'anticoagulació en situacions d'urgència però no per mesurar concentracions del fàrmac en el plasma. Per això, els mètodes cromogènics anti-Xa (amb el seu calibrador específic) han demostrat una eficàcia acceptable (18). La INR (acrònim de *International normalized ratio*) no s'ha d'utilitzar, ja que està dissenyat pel tractament amb fàrmacs antivitaminà K.

Apixaban: no existeix un procediment global que proporcioni informació sobre l'efecte anticoagulant en situacions d'urgència a causa de la gran variabilitat entre reactius. Tot i que els reactius són sensibles, la prolongació del temps tan sols informa que el pacient està prenent el fàrmac. S'està desenvolupant un procediment de TP modificat en el que s'afegeix clorur càlcic a la tromboplastina per prolongar el temps de coagulació i incrementar la sensibilitat al fàrmac. Els mètodes cromogènics anti-Xa amb un calibrador per l'apixaban, són els més fiables per mesurar la seva farmacodinàmica (7,18).

Edoxaban: el TP és més sensible que el TTPa per a la monitorització de l'efecte anticoagulant, però, la informació que proporciona és variable i depenent dels reactius utilitzats. Els procediments per mesurar els inhibidors anti-Xa són útils per a determinar les concentracions del fàrmac encara que disminueix l'exactitud davant concentracions supraterapèutiques (16). A la Taula 1 podreu trobar una proposta per la monitorització dels diferents ADs.

Finalment, cal tenir en compte que hi ha diferències entre els resultats dels procediments realitzats *in vitro* amb plasma al qual se li ha afegit el fàrmac, en relació als resultats obtinguts amb les mostres de pacients tractats amb els fàrmacs (5).

Fàrmac	Efecte anticoagulant	Concentració del fàrmac
Dabigatran	TTPa	TTd, ECT
Rivaroxaban	TP	Anti-Xa*
Apixaban	-	Anti-Xa*
Edoxaban	-	Anti-Xa

Taula 1. Monitorització dels ADs. TTPa: temps de coagulació induïda per una superfície en el plasma, TTd: temps de coagulació induïda per la trombina diluïda en el plasma, ECT; temps de coagulació induïda per ecarina en el plasma, TP: temps de coagulació induïda per factor tissular en el plasma, * amb calibradors específics pel fàrmac

Referències

1. Abdel-Kader L, Avendaño C, Calvo G. Criterios y recomendaciones generales para el uso de nuevos anticoagulantes orales (NACO) en la prevención del ictus y la

embolia sistémica en pacientes con fibrilación auricular no valvular. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico.

2013;<<http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/criterios-anticoagulantes-orales.pdf>> (Consultat 2018-03-23).

2. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, *et al.* Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-51.

3. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, *et al.* Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:883-91.

4. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, *et al.* Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-92.

5. Eby C. Novel anticoagulants and laboratory testing. *Int Jnl Lab Hem* 2013;35:262-68.

6. Douxfils J, Mullier F, Loosen C, Chatelain C, Cjatelain B, Dogné JM. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thromb Res* 2012;130:956-66.

7. Cuker A, Siegal DM, Crowther MA, Garcia DA. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the target-specific oral anticoagulant agents: A systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2014;16:1128-39.

8. Lippi G, Ardissino D, Quintavalla R, Vervellin G. Urgent monitoring of direct oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation: a tentative approach based on routine laboratory tests. *J Thromb Thrombolysis* 2014;38:269-74.

9. Schmitz EM, Boonen K, van den Heuvel DJ, van Dongen JL, Schellings MW, Emmen JM, *et al.* Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 2014;12:1636-44.

10. Lippi G, Favaloro EJ. Recent guidelines and recommendations for laboratory assessment of the direct oral anticoagulants (DOACs): is there consensus? *Clin Chem Lab Med* 2015;53:185-89.

11. Hapgood G, Butler J, Malan E, Chunilal S, Tran H. The effect of dabigatran on the activated partial thromboplastin time and thrombin time as determined by the Hemoclot thrombin inhibitor assay in patient plasma samples. *Thromb Haemos* 2013;110:308-15.

12. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, *et al.* Effect of dabigatran on coagulation assays and reversal strategies. *Thromb Haemos* 2010;103:1116-27.

13. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. *Thromb Haemos* 2012;107:985-97.

14. Iba T, Emmi M, Hiki M, Nagayama M, Aihara K, Tabe Y, Yuri M, *et al.* Comparison of prothrombin time test used in the monitoring of edoxaban and their evaluation as indicators of the reversal effect. *Int J Hematol* 2015. DOI 10.1007/s12185-016-1975-5.

15. Bonar R, Favaloro EJ, Mohammed S, Ahuja M, Pasalic L, Sioufi J, *et al.* The effect of the direct factor Xa inhibitors apixaban and rivaroxaban on haemostasis tests: a comprehensive assessment using *in vitro* and *ex vivo* samples. *Pathology* 2016;48:60-71.

16. Cuker A. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of edoxaban: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39:288-294.

17. Douxfils J, Chatelain B, Chatelain C, Dogné J-M, Mullier F. Edoxaban: Impact on routine and specific coagulation assays. *Thromb Haemost* 2016;27:368-81.

18. Douxfils J, Tamigniau A, Chatelain B, Goffinet C, Dogné JM, Mullier F. Measurement of non-VKA oral anticoagulants versus classic ones: the appropriate use of hemostasis assays. *Thromb J* 2014;;12:24.

19. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. *Thromb Haemos* 2012;107:985-97.