

FLÁVIA BITTAR BRITTO ARANTES

**Efeito dos anticoagulantes sobre a
agregabilidade plaquetária: ação da heparina de
baixo peso molecular Enoxaparina, e do inibidor
direto da trombina Dabigatrana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Nicolau

SÃO PAULO

2018

FLÁVIA BITTAR BRITTO ARANTES

**Efeito dos anticoagulantes sobre a
agregabilidade plaquetária: ação da heparina de
baixo peso molecular Enoxaparina, e do inibidor
direto da trombina Dabigatrana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Nicolau

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Arantes, Flávia Bittar Britto
Efeito dos anticoagulantes sobre a
agregabilidade plaquetária : ação da heparina de
baixo peso molecular enoxaparina, e do inibidor
direto da trombina dabigatrana / Flávia Bittar
Britto Arantes. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: José Carlos Nicolau.

Descritores: 1.Dabigatrana 2.Enoxaparina 3.Doença
da artéria coronariana 4.Aspirina 5.Agregação
plaquetária 6.Plaquetas

USP/FM/DBD-192/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Epígrafe

*“ Não existe o impossível para quem acredita, para quem se prepara e para quem
persevera incansavelmente ”*

João Bittar

Dedicatória

Aos meus pais, Sâmia e Galvão, por serem exemplos de força, brilhantismo, nobreza e amor. A minha gratidão por sempre estimularem o melhor em mim.

Às minhas irmãs, Renata, Karina e Ana Paula, pelas risadas eternas, o apoio incondicional e o carinho diários.

À minha avó Icanusa, hoje espírito de luz, por ser a pessoa mais inspiradora, gentil e aconchegante que conheci. A saudade do seu sorriso será eterna. E ao meu avô, João Bittar, por ser mestre da escola e da vida, desde os primeiros estudos, me permitindo chegar até aqui. Por constantemente nos ensinar que a força vem da fé inabalável.

Ao meu marido Sânzio, por ser meu porto seguro, meu cúmplice, meu amor e meu maior incentivador.

À tia Fátima, por todos os cuidados e por ser tão essencial em nossas vidas.

Aos meus familiares e amigos, por estarem sempre presentes, mesmo quando minha ausência se fez tão constante,

E principalmente ao meu filho Rafael, por ressignificar o amor em meu coração; e por ser, mesmo tão pequenino e delicado, o ser humano mais forte, guerreiro e cheio de luz que conheci em minha vida.

Agradecimentos

À Deus, por sustentar minha fé, me fazendo capaz e determinada e sempre iluminando meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Nicolau, pelos ensinamentos constantes, exemplo de vida, disciplina e devotamento, e por ser um mestre tão querido.

Às secretarias da UCCA Cláudia Cizzoto e Francis Nunes, por serem anjos anônimos, sempre cheias de presteza e gentileza na colaboração com nossos projetos.

Ao professor Quintiliano, pela paciência e contribuição essencial nas análises estatísticas deste trabalho.

À Dra. Célia Maria Cassaro Strunz e toda sua primorosa equipe pela colaboração constante na execução de exames deste estudo.

À Dra. Tânia Rubia Rocha, pela fundamental ajuda e orientação na efetivação dos exames do protocolo.

Aos preceptores e amigos da Unidade Clínica de Coronariopatia Aguda (UCCA), Dr. Luciano Moreira Baraciolli, Dr. Fernando Ganem, Dr Remo Holanda de Mendonça Furtado, Dr. Marcelo Franken, Prof. Dr. Roberto Rocha Correia Veiga Giraldez, Dr. Felipe Galego Lima, pelos ensinamentos e apoio constantes.

Aos estagiários e pós-graduandos da UCCA, André Franci, Carlos José Gonçalves Barbosa Dornas, Fernando Reis Menezes, Carlos Kenji Nakashima, Talia Falcão Dalçóquio, Marco Antonio Scanavinni e Aline Gehlen Ferrari pelo companheirismo, risadas e cafés.

Aos pacientes do Instituto do Coração da FMUSP, pela sua contribuição altruísta. À vocês o meu respeito, admiração e eterna gratidão.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

	Lista de abreviaturas e siglas	
	Lista de figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Breve histórico dos anticoagulantes.....	02
1.2	Heparinas.....	03
1.3	Anticoagulantes orais.....	05
1.4	Principais estudos que testaram anticoagulantes em pacientes com síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis.....	10
1.5	Efeito dos anticoagulantes sobre a agregabilidade plaquetária	13
1.5.1	Interação entre os principais fatores de coagulação e as plaquetas.	13
1.5.2	Evidências sobre possível interação entre anticoagulantes e agregabilidade plaquetária.....	15
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo primário.....	22
2.2	Objetivos secundários.....	22
3	MÉTODOS.....	23
3.1	Desenho do Estudo.....	24
3.2	Plano de estudo.....	24
3.2.1	Critérios de inclusão.....	24
3.2.2	Critérios de exclusão.....	25
3.2.3	Avaliação médica e cronologia.....	26
3.2.4	Descrição sucinta dos principais testes laboratoriais.....	28
3.3	Análises estatísticas	31
3.3.1	Cálculo amostral.....	31
3.3.2	Análise Estatística.....	31

3.4	Financiamento.....	32
3.5	Questões Éticas.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Seleção dos pacientes.....	34
4.2	Características basais da população.....	35
4.3	Comparação da agregabilidade plaquetária entre os grupos dabigatrana e enoxaparina.....	37
5	DISCUSSÃO.....	46
5.1	Limitações do estudo.....	51
6	CONCLUSÕES.....	53
7	ANEXOS.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	62

Listas

AAS	ácido acetil salicílico
ADP	adenosina difosfato
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
AT	antitrombina
AI	angina instável
AUC	área sob a curva
AVE	acidente vascular encefálico
AVK	antagonista da vitamina K
COX-1	cicloxigenase 1
CRM	cirurgia de revascularização miocárdica
Da	dalton
DAPT	dupla antiagregação antiplaquetária
DLP	dislipidemia
DM	diabetes mellitus
DRC	doença renal crônica
ECT	tempo de coagulação do ecarin
FA	fibrilação atrial
FC	frequência cardíaca
Fator IIa	trombina
FT	fator tecidual
GPIIb/IIIa	glicoproteína IIb/IIIa
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	hemoglobina glicada
HBPM	heparina de baixo peso molecular
HDL	lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HNF	heparina não fracionada
IAM	infarto agudo do miocárdio
IAMCEST	infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST
IAMSST	infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST
ICP	intervenção coronária percutânea

IDT	inibidor direto da trombina
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IL6	interleucina 6
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
ME	microscopia eletrônica
MEA	<i>Multiple Electrode Aggregometry</i>
MEA-ASPI	<i>Multiple Electrode Aggregometry</i> com agonista ácido araquidônico
MEA-TRAP	<i>Multiple Electrode Aggregometry</i> com peptídeo ativador do receptor da trombina
MFC	máxima firmeza do coágulo
NACO	novos anticoagulantes orais
OR	<i>odds ratio</i>
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PAR-1	receptor ativado por protease-1
PCR	proteína C reativa
PGH₂	prostaglandina H ₂
RNI	razão de normatização internacional
RR	risco relativo
RTPA	relação do tempo de tromboplastina parcial ativado
SIMI	síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis
TC	tempo de coagulação
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TEV	tromboembolismo venoso
TFC	tempo de formação do coágulo
TFT	tempo em faixa terapêutica
TIMI	<i>Thrombolysis In Myocardial Infarction</i>
TP	tempo de protrombina
TRAP	peptídeo ativador do receptor da trombina
TT	tempo de trombina
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativado
TXA2	tromboxano A2

TXB2	tromboxano B2
UA	unidade arbitrária
URA	unidades de reação à aspirina

Figura 1	Atuação dos anticoagulantes no processo de hemostasia.....	03
Figura 2	Mecanismo de ação dos inibidores diretos da trombina comparados com a heparina.....	09
Figura 3	Cascata de coagulação: modelo baseado em interação entre os fatores de coagulação, superfície das plaquetas e células endoteliais.....	15
Figura 4	Fluxograma de visitas e procedimentos do estudo.....	27
Figura 5	Fluxograma de seleção dos pacientes.....	35
Figura 6	Diferença da agregabilidade plaquetária em relação aos valores basais de acordo com o uso da dabigatrana ou da enoxaparina. * teste T-Student pareado; &teste de Wilcoxon..	38
Figura 7	Resultados da agregabilidade plaquetária pelo Multiplate[®] Aspirin (U) : valores médios basal e após o uso da dabigatrana e da enoxaparina.....	39
Figura 8	Resultados da agregabilidade plaquetária pelo Tromboxano B2 (pg/ml): valores de mediana basal e após o uso da dabigatrana e da enoxaparina.....	40
Figura 9	Análise de subgrupos em relação à valores de MEA-ASPI > 40U.....	45

Tabela 1	Comparação entre AVK e NACO.....	06
Tabela 2	Comparação dos diferentes NACO em relação à varfarina quanto aos desfechos de eficácia e segurança.....	07
Tabela 3	Características basais dos pacientes na visita 1.....	35
Tabela 4	Testes plaquetários: comparação entre Dabigatrana e Enoxaparina.....	41
Tabela 5	Resultados do coagulograma pelo RNI e RTPA: valores basal e após o uso da dabigatrana e da enoxaparina.....	42
Tabela 6	Avaliação da cinética do coágulo.....	42
Tabela 7	Comparação dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-6)	43
Tabela 8	Correlação entre a variação dos marcadores inflamatórios e do MEA-ASPI após dabigatran e após enoxaparina.....	44

Resumo

Arantes FBB. *Efeito dos anticoagulantes sobre a agregabilidade plaquetária: ação da heparina de baixo peso molecular Enoxaparina, e do inibidor direto da trombina Dabigatrana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A interação entre os anticoagulantes e a agregabilidade plaquetária é complexa. Dados laboratoriais prévios mostraram que a dabigatrana aumenta a excreção urinária de metabólito do tromboxano, indicando efeito de ativação de plaquetas. Posteriormente, dados do estudo RELY sugeriram que a dabigatrana 150mg poderia aumentar o risco de infarto do miocárdio em pacientes com fibrilação atrial.

Objetivos: Comparar a influência da Dabigatrana e Enoxaparina na agregabilidade plaquetária.

Métodos: Estudo prospectivo, intervencionista, realizado em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) crônica em uso de aspirina em baixas doses. Os indivíduos foram inicialmente designados para dabigatrana 150mg, 2x/dia, por 5 dias, seguido por um período de *washout* de 30 dias e depois para enoxaparina 1mg/kg, 2x/dia, por um período adicional de 5 dias. Os testes de função plaquetária foram realizados no início e após cada fase de intervenção, usando agregometria de sangue total por Impedância elétrica (MEA) (objetivo primário), ELISA para determinação quantitativa de tromboxano B2 (TXB2), Verify Now Aspirin e testes de coagulação (objetivos secundários).

Resultados: Em comparação com os valores basais, a dabigatrana aumentou a agregabilidade plaquetária avaliada pelo teste MEA-ASPI (+5U \pm 24,1), enquanto a enoxaparina diminuiu a agregabilidade plaquetária (-6U \pm 22,2), p=0,012 para a comparação entre os grupos). O mesmo padrão foi observado

usando o ensaio TXB2 (+2pg/mL para dabigatrana, -13pg/mL para enoxaparina, $p = 0,011$). Não houve diferenças significativas entre os dois grupos em relação aos demais testes. Individualmente, a enoxaparina diminuiu significativamente a agregabilidade plaquetária por TXB2 [33 (16,5 - 95)pg/mL vs. 20 (10-52) pg/mL, respectivamente, $p = 0,026$), mas não foram observadas diferenças significativas individuais com a dabigatrana em relação aos valores basais.

Conclusões: Em relação à agregabilidade plaquetária, há um efeito oposto significativo da dabigatrana (aumento) em comparação com a enoxaparina (diminuição). Individualmente, foi observada uma diminuição significativa na agregabilidade plaquetária apenas com a enoxaparina, quando comparada com valores basais.

Descritores: dabigatrana, enoxaparina, doença arterial coronariana, aspirina, agregabilidade plaquetária

Abstract

Arantes FBB. *Influence of dabigatran and enoxaparin on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Background: The interaction between anticoagulants and platelet aggregation is complex. Previous laboratory data have shown that dabigatran increases urinary thromboxane metabolite excretion, indicating platelet-activating effect. Thereafter, data from RELY trial suggested that dabigatran 150mg could enhance the risk of myocardial infarction in atrial fibrillation patients.

Objectives: To compare the influence of Dabigatran and Enoxaparin on platelet aggregation.

Methods: Prospective, interventional study conducted in chronic coronary artery disease (CAD) patients taking low-dose aspirin. Subjects were assigned initially to dabigatran 150mg bid for 5 days followed by a washout period of 30 days and then to enoxaparin 1mg/kg bid for an additional 5 days period. Platelet function tests were performed at baseline and after each intervention phase using multiple electrode aggregometry (MEA) (primary endpoint), ELISA for plasma quantitative determination of thromboxane B₂, Verify Now Aspirin and coagulation tests as secondary endpoints. **Results:** In comparison with the baseline values, dabigatran increased platelet aggregation evaluated by MEA-ASPI test (+5U ± 24.1), whereas enoxaparin decreased platelet aggregation (-6U ± 22.2), p=0.012 for the comparison between the groups). The same pattern was observed using the TxB₂ assay (+2pg/mL for dabigatran, -13pg/mL for enoxaparin, p=0.011). There were no significant differences between both groups regarding the VerifyNow Aspirin or the other platelet function and coagulation tests utilized. Individually, enoxaparin significantly decreased

platelet aggregation by TXB2 [33 (16,5 - 95) pg/mL vs. 20 (10-52) pg/mL, respectively, $p = 0.026$) but no significant differences were observed with dabigatran when individually compared to baseline. Conclusions: Regarding platelet aggregation, there is a significant opposite effect of dabigatran (increase) in comparison with enoxaparin (decrease). Individually, a significant decrease in platelet aggregability was observed with enoxaparin, but no significant differences were observed with dabigatran.

Descriptors: dabigatran, enoxaparin, coronary artery disease, aspirin, platelet aggregation.

1. Introdução

1.1 Breve histórico dos anticoagulantes

Por mais de 60 anos, a disponibilidade de anticoagulantes orais tem tornado possível a prevenção primária e secundária efetiva do tromboembolismo arterial e venoso em diferentes contextos clínicos. O maior desafio ao uso de anticoagulantes, no entanto, é avaliar adequadamente o benefício da prevenção de eventos tromboembólicos em relação ao risco de complicações hemorrágicas e, eventualmente, de possíveis efeitos paradoxais protrombóticos.

A história da descoberta e desenvolvimento dos anticoagulantes tem aspectos peculiares. O efeito anticoagulante da heparina foi descoberto por McLean em 1915, um estudante do Hospital Johns Hopkins, durante uma investigação sobre os efeitos procoagulantes da cefalina, fosfolípideo produzido pelas plaquetas em cães.¹

A varfarina, por outro lado, foi descoberta como agente causal de um distúrbio hemorrágico em bovinos, recorrente na década de 30, passando a ser comercializada como raticida.²

Na década de 50 o Coumadin[®], nome comercial da varfarina, passou a ser utilizado como anticoagulante oral em humanos para tratamento de diferentes situações clínicas. Historicamente, data de 1955 um dos primeiros usos da varfarina no contexto das síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis (SIMI), no tratamento do infarto agudo do miocárdio do então presidente norte-americano Dwight Eisenhower.^{1,2}

Atualmente, os anticoagulantes estão disponíveis na forma parenteral, sendo os principais as heparinas, a bivalirudina (inibidor direto da trombina) e o fondaparinux (pentassacarídeo sintético que inibe seletivamente o fator Xa); e, por via enteral, os antagonistas da vitamina K (AVK) e os novos anticoagulantes orais (NACO) (Figura 1).³

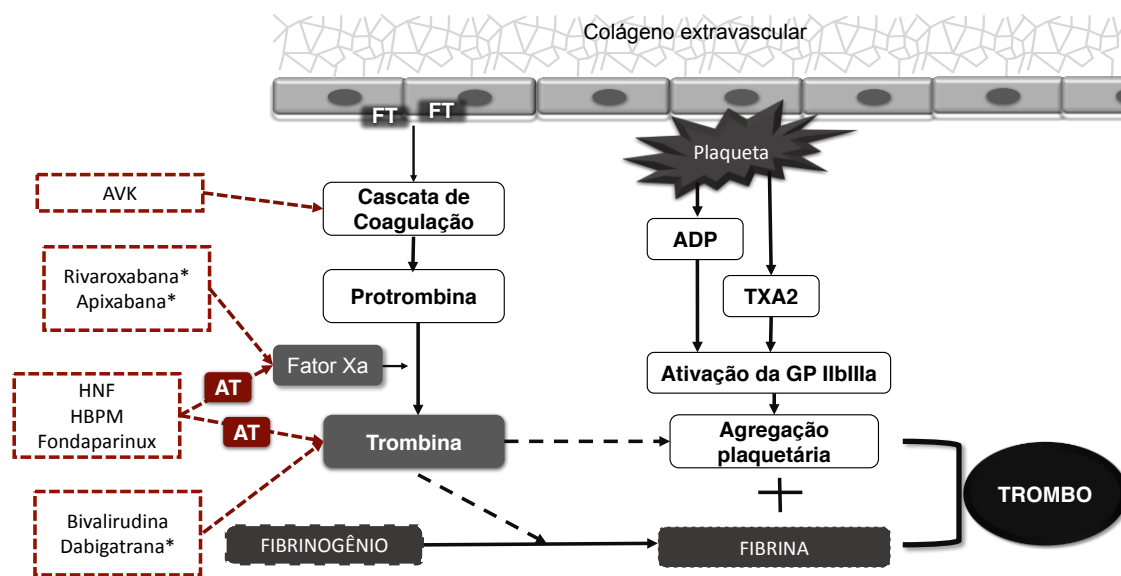


Figura 1- Atuação dos anticoagulantes no processo de hemostasia.

Legenda: *NACO; AVK – antagonistas da vitamina K; FT- fator tecidual; AT – antitrombina; HNF – heparina não fracionada; HBPM – heparina de baixo peso molecular; TXA2 - tromboxano A2; GPIIb/IIIa – glicoproteína IIb/IIIa

1.2 Heparinas

A heparina não fracionada (HNF) é um poliânion de carga elevada, composto por cadeias de 18 a 50 sacarídeos, com peso molecular de 15.000 Daltons (Da). A atividade anticoagulante apresentada pela heparina resulta da

ligação desta com um inibidor da serino protease, a antitrombina (AT). Tal ligação acarreta alteração conformacional na molécula de AT resultando no aumento da inibição da trombina (fator IIa) e de outras serino proteases envolvidas na coagulação sanguínea.⁴

A heparina promove, ainda, inibição dos fatores de coagulação XI, X, IX ativados e do complexo 'fator tecidual – fator VIIa', promovendo alterações laboratoriais do tempo de protrombina (TP), do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) e do tempo de trombina (TT).⁵

Por conta, fundamentalmente, da dificuldade de manutenção da heparinização em níveis terapêuticos, surgiu a idéia de se desenvolver compostos de mais fácil manuseio e, se possível, mais eficazes. Nos anos de 1970, o professor Carl Peter Dietrich iniciava estudos que permitiram isolar a heparina de baixo peso molecular.⁶ A despolimerização da HNF levou à obtenção de compostos heterogêneos, de mais baixo peso molecular (peso médio inferior a 8.000 Da), que receberam o nome genérico de heparinas fracionadas ou de baixo peso molecular (HBPM). Semelhante à HNF, cerca de um terço das cadeias da HBPM têm o sítio para ligação de pentassacarídeos para a antitrombina, mas, ao contrário da HNF, apenas cadeias com 18 ou mais unidades de sacarídeos ligam-se à trombina.⁷

Assim, as HBPM têm baixa atividade antitrombínica, mas mantêm a capacidade de inativar o fator Xa (proporção anti-Xa e anti-IIa de 2:1 a 4:1). Portanto, laboratorialmente, somente alteram o TTPa quando utilizadas em altas doses e, devido às suas características farmacológicas, permitem dispensar a monitoração na maioria dos pacientes, com exceção de grávidas,

obesos e pacientes com disfunção renal, nos quais a dosagem de anti-Xa ativado, se disponível, é indicada.⁸

1.3 Anticoagulantes orais

Durante os últimos 60 anos, os antagonistas orais de vitamina K, como a varfarina e a femprocumona, têm sido os principais anticoagulantes orais prescritos. A varfarina, derivada do 4-hidroxicoumarin, atua inibindo a vitamina K epóxido-redutase, suprimindo, assim, a síntese eficaz de formas biologicamente ativas dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (II, VII, IX e X), bem como dos fatores reguladores da coagulação, as proteínas C e S.⁹

No entanto, seu impacto na prevenção de fenômenos trombóticos tem sido dificultado por várias limitações que comprometem sua eficácia e segurança. Dentre elas:

- inconstância farmacocinética e farmacodinâmica com início de ação lento e imprevisível, o que geralmente tende a prolongar a hospitalização e aumentar os custos do tratamento;
- grande variabilidade individual na resposta à diferentes dosagens e estreita janela terapêutica, o que demanda acompanhamento regular da anticoagulação e resulta em complexos esquemas de prescrição de dosagens individuais;
- interações medicamentosas e alimentares, com necessidade constante de orientação sobre a necessidade de monitorização de rotina devido

ao aumento no risco de hemorragia ou trombose, quando fora da janela terapêutica.

Como consequência das limitações ao uso dos AVK, a qualidade do controle da anticoagulação é frequentemente subótima entre aqueles que recebem o tratamento e muitos pacientes em risco de tromboembolismo permanecem grandes períodos fora da faixa terapêutica.^{10,11}

Além disso, apenas 50% dos pacientes com FA em risco de acidente vascular encefálico (AVE), que são elegíveis para a terapia anticoagulante, são tratados com um AVK por contraindicações sociais ao uso ou por insegurança da equipe assistente.^{12,13}

Tais desafios levaram ao desenvolvimento de novos anticoagulantes orais buscando melhores perfis farmacodinâmico e farmacocinético (Tabela 1).^{3,14}

Tabela 1 - Comparação entre AVK e NACO.

Características	AVK	NACO
Início de ação	Lento	Rápido
Dose	Variável	Fixa
Efeito alimentar	Sim	Não
Interação medicamentosa	Muitas	Raras
Monitorização	Sim	Não (incerto)
Meia-vida	Longa	Curta
Antídotos ^{15,16}	Sim	Sim
Posologia	1x ao dia	1-2x ao dia

AVK=antagonistas da vitamina K; NACO=novos anticoagulantes orais.

Os estudos multicêntricos randomizados controlados “*Apixaban for Reduction of Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial*”, “*Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy (RE- LY) trial*”¹⁷ e “*Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared With Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation (ROCKET AF)*” comprovaram a não inferioridade e a segurança do uso no longo prazo dos NACO apixabana, dabigatrana e rivaroxabana, quando comparados à varfarina, na prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes portadores de FA (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos diferentes NACO em relação à varfarina quanto aos desfechos de eficácia e segurança

Característica	Dabigatrana (110mg)	Dabigatrana (150mg)	Rivaroxabana	Apixabana
Eficácia	Não Inferior	Superior	Não Inferior	Superior
AVE isquêmico	Similar	Redução	Similar	Similar
AVE hemorrágico	Redução	Redução	Redução	Redução
Sangramento maior	Redução	Similar	Similar	Redução
IAM	Similar	Aumento	Similar	Similar
Posologia	2x/d	2x/d	1x/d	2x/d
TFT(mediana)	67%	67%	58%	66%

Eficácia = AVE ou eventos embólicos sistêmicos; AVE= acidente vascular encefálico; IAM=infarto agudo do miocárdio TFT – tempo em faixa terapêutica no braço varfarina;

De especial interesse no presente estudo, a Dabigatrana é um inibidor direto da trombina (IDT), único medicamento oral dessa classe liberado para uso clínico.¹⁸

O produto é um IDT univalente que se liga ao sítio ativo da trombina, inativando seu efeito. A trombina possui um sítio ativo e dois exossítios de ligação secundários: o exossítio 1 liga-se a substratos, como a fibrina no trombo; e o exossítio 2 é o domínio de ligação à heparina.¹⁹

Os IDTs bloqueiam a atividade da trombina livre no plasma e também daquela ligada ao trombo. A atividade anticoagulante da heparina, por sua vez, depende do complexo heparina-antitrombina, o qual não consegue se ligar ao conjunto fibrina-trombina presente nos coágulos, perpetuando o risco de trombose e constituindo uma vantagem importante dos IDTs sobre as heparinas (Figura 2).¹⁹

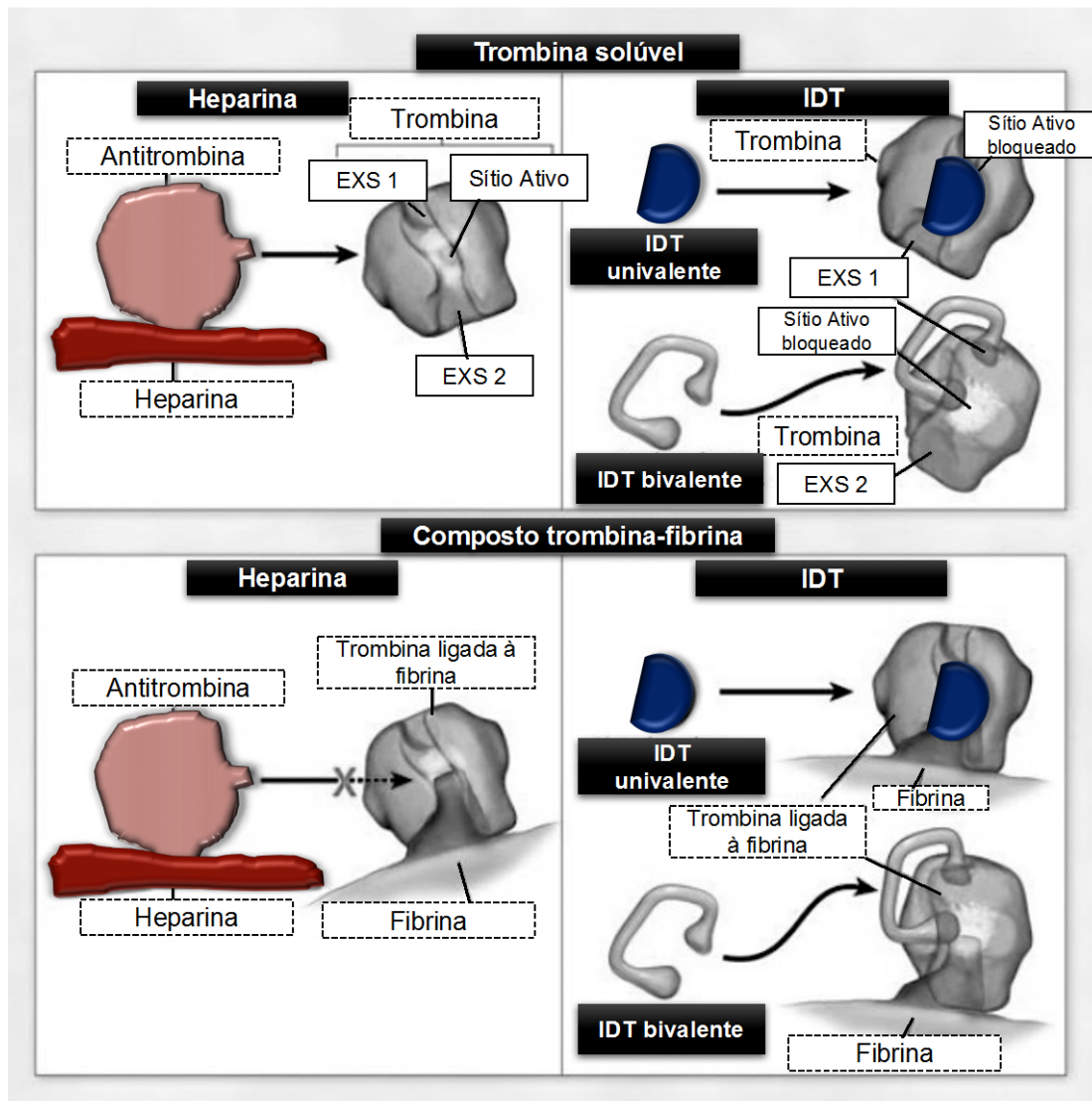


Figura 2 - Mecanismo de ação dos inibidores diretos da trombina comparados com a heparina. Legenda: IDT – inibidor direto da trombina; EXS- exossítios. Adaptado de Di Nisio, NEJM 2005.¹⁹

Assim, a dabigatrana dificulta a conversão do fibrinogênio em fibrina, a amplificação com retroalimentação positiva da ativação da coagulação, a reticulação dos monômeros de fibrina e a ativação das plaquetas.¹⁸

Seu pico plasmático é atingido em 1,5 a 3 horas e a meia vida plasmática, após administração de dose única oral, é de aproximadamente 8 horas e de 14 a 17 horas após múltiplas doses, tendo o produto excreção renal.¹⁸

Este medicamento foi testado inicialmente em dois grandes estudos de fase III: no estudo RE-MODEL,²⁰ nas doses de 150mg 2 x ao dia e 220 mg 1 x ao dia, teve eficácia e segurança semelhante à enoxaparina na prevenção de trombose venosa em pacientes submetidos a cirurgia de implante de prótese de joelho. Isso levou à sua aprovação pelas autoridades competentes e início da comercialização do mesmo, inclusive em nosso meio.

Já no estudo RE-LY¹⁷, Connolly e cols. compararam Dabigatrana, nas doses de 110 e 150 mg 2 x ao dia, com a varfarina, tendo como meta a prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes portadores de FA crônica. O estudo demonstrou que a dabigatrana, na dose de 150 mg, foi significativamente superior à varfarina em relação à incidência de AVE isquêmico; além disso, diminuiu também a incidência de AVE hemorrágico, o que também foi observado com outros NACO. Nesta dose, a incidência de sangramentos maiores foi similar à varfarina. Por outro lado, a Dabigatrana na dose de 110 mg foi tão eficaz quanto a varfarina na prevenção de tromboembolismo arterial, com diminuição significativa na incidência de eventos hemorrágicos.

1.4 Principais estudos que testaram anticoagulantes em pacientes com síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis

As heparinas são importantes terapias adjuvantes no tratamento das SIMI. Historicamente as evidências quanto ao uso de HNF como adjuvante ao fibrinolítico em pacientes com infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (IAMCEST) datam da década de 80, com base nos estudos

GISSI-2²¹ e ISIS-3²², que utilizaram a HNF de forma subcutânea. Posteriormente, o estudo GUSTO-I²³ comparou a HNF intravenosa (bolus de 5.000 UI seguida de infusão contínua de 1.000 UI/h, ajustando o TTPa para 60 a 85 segundos) com a HNF subcutânea da maneira utilizada nos estudos GISSI-2 e ISIS-3 anteriormente citados.

O importante estudo que forneceu dados de eficácia e segurança para o uso das heparinas no IAMCEST foi o ExTRACT-TIMI 25²⁴, o qual demonstrou a superioridade da HBPM (no caso a enoxaparina) em relação à HNF, em pacientes tratados com fibrinolíticos. Além da evidente comodidade posológica da HBPM, morte e infarto do miocárdio recorrente não fatal (desfecho primário de eficácia) aos 30 dias foram menores no grupo enoxaparina às custas de aumento discreto, porém significativo, na incidência de sangramento maior (1,4% vs 2,1%, $p < 0,001$). Importante salientar que o benefício líquido foi significativamente favorável à HBPM.

Em relação a pacientes com SIMI sem supradesnível do segmento ST, ao final da década de 80 Théroux e cols. demonstraram que tanto a terapia isolada com ácido acetilsalicílico (AAS) ou HNF, assim como a associação de ambas, reduziram significativamente a ocorrência de IAM em pacientes com angina instável, quando comparada ao grupo placebo.²⁵

Anos mais tarde, o estudo SYNERGY²⁶ randomizou 10.027 pacientes com SIMI de alto risco e programados para estratégia invasiva precoce, para receberem enoxaparina ou HNF. O objetivo primário - desfecho composto de morte por todas as causas ou infarto do miocárdio em 30 dias após a randomização – foi semelhante entre os grupos, demonstrando não inferioridade da enoxaparina em relação a HNF. Análise secundária em

pacientes que utilizaram apenas um tipo de heparina durante a hospitalização demonstraram benefício significativo com o uso da HBPM, em relação à HNF.

Em relação aos NACO, alguns estudos testaram os mesmos em adição à dupla antiagregação plaquetária (DAPT) em pacientes com SIMI.

O APPRAISE-2²⁷ randomizou 7.392 pacientes, em média 6 dias após o início de sintomas compatíveis com SIMI, para uso de apixabana ou placebo. O estudo foi interrompido por significativo aumento de sangramentos maiores, sem benefício significativo em termos de eventos isquêmicos. A dose da apixabana utilizada foi a mesma testada no contexto da fibrilação atrial (5mg, 2 vezes ao dia), o que explicaria o excesso de sangramentos graves.

O emprego da rivaroxabana em população semelhante foi avaliado no estudo ATLAS ACS2-TIMI 51.²⁸ Os pacientes foram randomizados para: rivaroxabana 2,5mg, rivaroxabana 5mg e placebo (ambas as doses 2 vezes ao dia e bem inferiores àquelas testadas no contexto da fibrilação atrial). A dose de 2,5mg foi a que apresentou melhores resultados, com redução relativa de 16% no desfecho composto de morte cardiovascular, IAM e AVE (p=0,007) ao final do seguimento de 2 anos, inclusive com redução significativa de óbito cardiovascular (RR 0,66; p=0,005) e óbito por qualquer causa (RR 0,68; p=0,004). Do ponto de vista de segurança, o grupo rivaroxabana apresentou aumento significativo na incidência de sangramentos não relacionados à cirurgia cardíaca (RR 3,46; p<0,001), porém sem aumento significativo na incidência de sangramentos fatais (p=0,45).²⁸ Como não há autorização de uso pelas autoridades brasileiras (ao contrário das Europeias)^{29,30}, não há recomendação formal das diretrizes brasileiras sobre o produto (nessa indicação).^{3,31,32}

Com relação aos inibidores orais da trombina, a dabigatrana foi avaliada contra placebo após SIMI somente em relação ao desfecho primário de sangramento, em uso concomitante com dupla antiagregação plaquetária, no estudo de fase 2 RE-DEEM.³³ Nesse trabalho foi evidenciado significativo aumento na incidência de sangramentos nas diferentes doses avaliadas (50mg, 75mg, 110mg e 150mg). Interessantemente, a avaliação do desfecho secundário de eficácia para IAM não fatal foi numericamente, porém não estatisticamente, maior em todas as doses de dabigatrana, especialmente de 110mg (1,7%) e 150mg (2,3%), quando comparado com placebo (1,1%).³³

1.5 Efeito dos anticoagulantes sobre a agregabilidade plaquetária

1.5.1 Interação entre os principais fatores de coagulação e as plaquetas

O sistema de coagulação foi, por muito tempo, considerado como sendo constituído apenas por fatores de coagulação e plaquetas. Atualmente, sabe-se que o mesmo é multifacetado, extremamente balanceado, com a participação de componentes celulares e moleculares. O processo de coagulação sanguínea se inicia com a exposição do fluxo sanguíneo a células que expressam fator tecidual. Uma vez combinado com o FT, o fator VII é ativado (FVIIa). O complexo FT/FVIIa ativa o fator X e fator IX. O fator Xa, permanecendo na superfície celular juntamente com o fator V, convertem uma pequena quantidade de protrombina em trombina, que participa fundamentalmente da fase de ampliação do trombo.³⁴

A adesão de plaquetas ao colágeno subendotelial é mediada pelo

receptor de colágeno plaquetário específico (glicoproteína Ia/IIa) e o fator de vonWillebrand (FvW), os quais formam ligações entre plaquetas e fibras de colágeno. Além disso, a ativação induzida pelo colágeno gera a liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidos da membrana plaquetária, o qual é transformado em tromboxano A₂ (TXA₂) através da conversão enzimática pela ciclooxigenase 1 (COX-1).

A seguir, a trombina, formada pela cascata de coagulação, ativa as plaquetas por meio do receptor acoplado à proteína G na membrana plasmática plaquetária, o receptor ativado por protease-1 (PAR-1). Essa interação resulta em liberação do conteúdo dos grânulos de armazenamento (ADP, colágeno, entre outros). Tais agentes, agonistas agregadores, somados à trombina e ao TXA₂, modificam o complexo glicoproteico GPIIb/IIIa de modo que esse receptor tenha maior afinidade pelo FvW e pelo fibrinogênio, gerando o agregado plaquetário.³⁵

As plaquetas ativadas liberam, ainda, fator V na sua forma parcialmente ativada o qual é completamente ativado pela trombina e/ou fator Xa. As plaquetas ativadas têm agora fatores ativados Va, VIIIa e IXa em sua superfície.³⁵

A fase final, de propagação do trombo, é caracterizada pela produção de complexos tenases e protombinases (Va+Xa) que são agrupados na superfície das plaquetas ativadas. O complexo protrombinase intensifica importantemente a produção de trombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e também ativa o fator estabilizador da fibrina, fator XIII, para formar o coágulo de fibrina hemostático (Figuras 1 e 3).³⁵

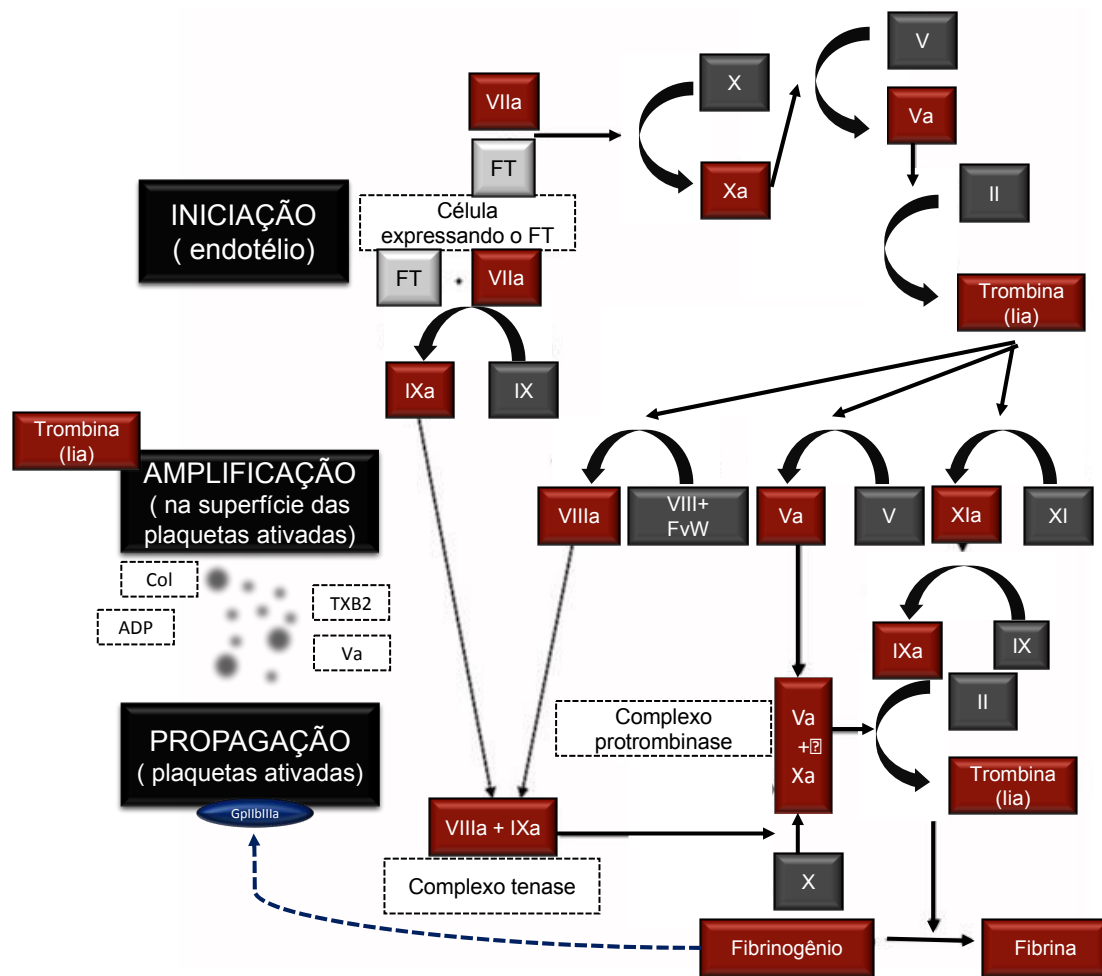


Figura 3 - Cascata de coagulação: modelo baseado em interação entre os fatores de coagulação, superfície das plaquetas e células endoteliais.
 Legenda: FT: fator tecidual; FvW: fator de vonWillebrand; Col: colágeno; TXB2: tromboxano B2; ADP: adenosina difosfato

1.5.2 Evidências sobre possível interação entre anticoagulantes e agregabilidade plaquetária

Considerando-se a complexa relação entre plaquetas e fatores de coagulação no processo de hemostasia, desde há muito se especula sobre

eventual interação e possíveis efeitos proagregantes entre os anticoagulantes e a agregação plaquetária.

Em pacientes coronariopatas, nos quais o uso de antiplaquetários e anticoagulantes tem indicação rotineira, tal relação segue ainda controversa. Os poucos estudos publicados sobre o assunto demonstram resultados conflitantes: enquanto alguns sugerem efeito inibitório da heparina sobre a função plaquetária, outros apontam que a heparina poderia promover um aumento na ativação plaquetária. Este efeito seria aparentemente mais evidente com a heparina não fracionada, mas foi também identificado com o uso de diferentes preparações de heparinas de baixo peso molecular.³⁶⁻³⁹

Xiao e Theroux compararam HNF versus HBPM em 43 pacientes portadores de angina instável quanto à função plaquetária e observaram: no grupo que utilizou dose terapêutica de HNF, houve aumento na circulação de plaquetas ativadas e hiperresponsividade plaquetária ao estímulo com o agonista adenosina difosfato (ADP) e peptídeo ativador do receptor da trombina (TRAP) ($p < 0,001$).⁴⁰

Quando comparadas entre si, a heparina não fracionada apresenta, de maneira recorrente em diferentes cenários, efeitos proagregantes plaquetários quando comparada com HBPM ou com controles.^{41,42} Montalescot e cols demonstraram que as HBPM reduzem a liberação do FvW no plasma quando comparado com HNF.⁴²

Mais recentemente, Anand e cols. avaliaram a função plaquetária em resposta a outro inibidor direto da trombina, a bivalirudina, em comparação à HNF em pacientes submetidos à intervenção coronariana percutânea em uso de clopidogrel. Foi observado que não só a heparina levou a aumento na

adesividade plaquetária induzida por cisalhamento, *in vivo*, como tal fenômeno foi comprovado morfológicamente por avaliação de microscopia eletrônica (ME). Nessa, observou-se intensa formação de pseudópodes, sugestiva de ativação plaquetária. Os pacientes que foram expostos à bivalirudina, por sua vez, apresentaram redução na função plaquetária e mantiveram plaquetas discóides - portanto, inativas - à ME.⁴³

Porém a consequência clínica da interação entre anticoagulantes e agregabilidade plaquetária permanecia desconhecida. No estudo RE-LY¹⁷, um dado potencialmente muito importante chamou a atenção da comunidade científica: a incidência de infarto do miocárdio no grupo que recebeu Dabigatrana 150mg duas vezes ao dia foi de 0.74% ao ano, superior à do grupo que recebeu warfarina (0.53% ao ano - RR 1.38, 95% IC, 1.00-1.91, $p=0.048$).¹⁷

Frente aos resultados do estudo RE-LY, os autores publicaram uma carta ao editor um ano após a publicação do artigo original, identificando 81 novos eventos de eficácia e segurança não reportados no trabalho original. Desses, 28 eram diagnóstico de IAM silencioso, pré-definido como aparecimento de novas ondas Q ao ECG e não reportados durante o decorrer do estudo RE-LY. Apesar da alteração no risco relativo para IAM relacionado à Dabigatrana 150mg [RR: 1,38 (1.00–1.91), $p= 0,048$] para [RR: 1,27 (0,94–1,71), $p= 0,12$], os autores declararam que não houve mudança na conclusão original do estudo.⁴⁴

Anos mais tarde, Hohnloser e cols. publicaram subanálise dos eventos isquêmicos miocárdicos do RE-LY (angina instável, parada cardíaca, morte cardiovascular e IAM) e concluíram novamente que não houve aumento

significativo nos mesmos.⁴⁵

Em posterior seguimento dos pacientes em uso de dabigatrana 110 ou 150mg por uma média de 2,3 anos, o estudo RELY-ABLE corroborou a baixa taxa de IAM de 0,72%/ano e 0,69%/ano, respectivamente, compatível com valores publicados na reanálise do trabalho original.⁴⁶

Ao mesmo tempo, revisão abrangente de dados individuais de pacientes dos estudos em fibrilação atrial e TEV, realizada com o patrocínio da própria Boehringer-Ingelheim[®], concluiu haver um efeito mais protetor da varfarina, mas não da enoxaparina, em comparação com a dabigatrana, na prevenção do infarto do miocárdio em múltiplos contextos clínicos.⁴⁷

Outra análise de subgrupo do Re-LY foi publicada no mesmo ano, avaliando os 6952 pacientes que fizeram uso concomitante de aspirina ou clopidogrel durante algum período do estudo (em média 66% do tempo do estudo), seja como prevenção primária ou secundária para DAC. De maneira instigante, observou-se que, apesar da dose de 150mg da dabigatrana manter a redução de AVE isquêmico e embolia sistêmica em relação à varfarina, seu efeito antitrombótico se tornou atenuado e não estatisticamente significativo quando avaliados os pacientes com e sem uso de antiplaquetários (RR 0.59; IC 95% 0,4-0,86 e RR 0.94; IC 95% 0,66-1,34, respectivamente).⁴⁸

Corroborando tais achados, metanálise publicada em 2014, composta por 14 ensaios clínicos randomizados, demonstrou que o uso da dabigatrana aumenta o risco de infarto agudo do miocárdio quando comparado a todos os tratamentos (varfarina, enoxaparina e placebo – RR 1,34 IC 95% 1,08-1,65, $p=0,007$). Contudo, tal resultado se deu especialmente às custas da comparação

com a varfarina, gerando na ocasião discussão sobre o efeito protetor da mesma sobre o IAM contra possível efeito proagregante da dabigatrana.⁴⁹

O estudo de fase 2 PETRO, que antecedeu o RE-LY, já havia sugerido possível ativação plaquetária pela dabigatrana, o que teoricamente causaria aumento paradoxal no risco de trombose. Os autores demonstraram aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 20% na excreção do tromboxano B2 urinário após doze semanas de uso de todas as doses de dabigatrana avaliadas, quando comparadas com varfarina. Interessantemente, esse efeito não foi observado em pacientes em uso de ácido acetilsalicílico.⁵⁰

O possível efeito proagregante plaquetário dos IDTs poderia ser explicado pelo constante estímulo da trombina como agonista plaquetário, ultrapassando a capacidade de bloqueio dos medicamentos.⁵¹

No estudo RE-ALIGN, foram observados constantes eventos trombóticos relacionados à dabigatrana, quando comparada à varfarina, em pacientes portadores de valva mecânica. Os investigadores especularam que o possível mecanismo seria o excesso de trombina gerado pela exposição do sangue à superfície artificial da válvula e do anel de sutura, sobrecarregando a capacidade de bloqueio da dabigatrana.⁵²

Ainda nesse sentido, um grupo de investigadores analisaram amostras de plasma de pacientes em uso de VKA versus dabigatrana e observaram níveis maiores de pico de trombina no grupo IDT.⁵³ Esse achado poderia explicar o potencial efeito protetor em relação ao sangramento, principalmente relacionado à diminuição do AVC hemorrágico, e o aumento dos eventos trombóticos, portanto IAM, relacionados ao uso da dabigatrana.

Em resumo, os estudos prévios que analisaram eventuais interações entre heparinas e agregabilidade plaquetária apresentaram resultados conflitantes, são de maneira geral antigos, por vezes com metodologias não mais utilizadas, e desenvolvidos em modelos sujeitos a muitos fatores externos que poderiam influenciar os resultados obtidos. Por outro lado, no caso da dabigatrana, há evidência clínica de aumento da incidência de eventos isquêmicos em pacientes com fibrilação atrial, sem que exista qualquer publicação, do que seja do nosso conhecimento, que tenha demonstrado explicação satisfatória para o achado.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de comparar, em pacientes coronariopatas crônicos em uso de AAS, a agregabilidade plaquetária após o uso de dabigatrana e enoxaparina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo primário

Comparar, em uma população de pacientes com DAC crônica em uso de aspirina, os efeitos da enoxaparina e da dabigatrana sobre a agregabilidade plaquetária avaliada pelo teste Multiplate® Aspirin (MEA-ASPI).

2.2 Objetivos secundários

- a. Analisar os efeitos individuais da enoxaparina e do dabigatran sobre a agregabilidade plaquetária pelo MEA-ASPI.
- b. Analisar o efeito da enoxaparina e da dabigatrana sobre a agregabilidade plaquetária analisadas pelos seguintes métodos: VerifyNow® Aspirin, Multiplate® TRAP, TXB2 sérico, agregometria óptica induzida por ADP e adrenalina.
- c. Avaliar os efeitos da enoxaparina e da dabigatrana sobre o coagulograma e sobre parâmetros de coagulação obtidos pelo tromboelastograma.
- d. Correlacionar o objetivo primário do estudo com os marcadores inflamatórios IL-6 e PCR-us.
- e. Analisar a incidência de maus respondedores nos grupos dabigatrana e enoxaparina no total da população e nos sub-grupos de pacientes diabéticos ou não, com idade ≥ 65 ou < 65 anos, e do sexo feminino ou masculino.

3. Métodos

3.1 Desenho do Estudo

Estudo prospectivo, aberto, no qual pacientes coronariopatas crônicos, estáveis, em acompanhamento ambulatorial e em uso de ácido acetilsalicílico, foram avaliados inicialmente quanto aos seus critérios de elegibilidade. Todos os pacientes selecionados receberam as mesmas medicações, em cada fase do estudo, de forma que cada indivíduo foi controle de si mesmo. Este protocolo foi devidamente registrado no clinicaltrials.gov sob o identificador NCT02389582.

3.2 Plano do estudo

3.2.1 Critérios de inclusão

- Idade >18 anos;
- Doença arterial coronária crônica, definida pela presença de infarto do miocárdio e/ou angioplastia coronária e/ou cirurgia de revascularização do miocárdio prévios, e/ou cineangiocoronariografia revelando obstrução de pelo menos 50% do diâmetro em um ou mais vasos epicárdicos;
- Uso atual de AAS.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Uso prévio, nos últimos 7 dias, de outro antiagregante plaquetário que não o AAS, ou uso de anticoagulante oral a qualquer tempo;
- Sangramento interno ativo;
- Gravidez ou mulher em idade fértil que não estivesse usando método contraceptivo confiável;
- Hemoglobina $<10\text{g/dL}$ ou Hematócrito $< 30\%$, Hematócrito $>50\%$, Plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$ ou $> 500.000/\text{mm}^3$, taxa de filtração glomerular $< 40 \text{ mL/minuto}/1,73\text{m}^2$ pelo método MDRD; ⁵⁴
- Realização de intervenção coronária percutânea (ICP) há menos de 30 dias se utilizado *stent* convencional, ou 365 dias se utilizado *stent* farmacológico;
- Cirurgia de revascularização do miocárdio nos últimos 90 dias;
- Fibrilação atrial;
- Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável com ou sem supradesnível do segmento ST nos últimos 60 dias;
- Neoplasia maligna conhecida;
- Presença de úlcera péptica em atividade nos últimos 60 dias ou hemorragia digestiva alta em qualquer época da vida;
- Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2.3 Avaliação médica e cronologia

A primeira visita, agendada por contato telefônico, foi realizada no momento da inclusão do paciente. Nessa oportunidade foram realizadas:

- i. Anamnese;
- ii. Exame físico;
- iii. Preenchimento de questionário com características demográficas, história médica pregressa e medicações de uso prévio;
- iv. Checagem da aderência do paciente ao uso prévio de AAS por, pelo menos, sete dias, já que este era um importante critério para inclusão do paciente no estudo;
- v. Coleta de amostras sanguíneas para as análises previstas.

Posteriormente, todos os pacientes foram orientados e receberam as mesmas medicações nas doses efetivas preconizadas, em cada fase do estudo.

Cada indivíduo foi controle de si mesmo e seguiu o cronograma de 4 visitas, conforme fluxograma da figura 4.

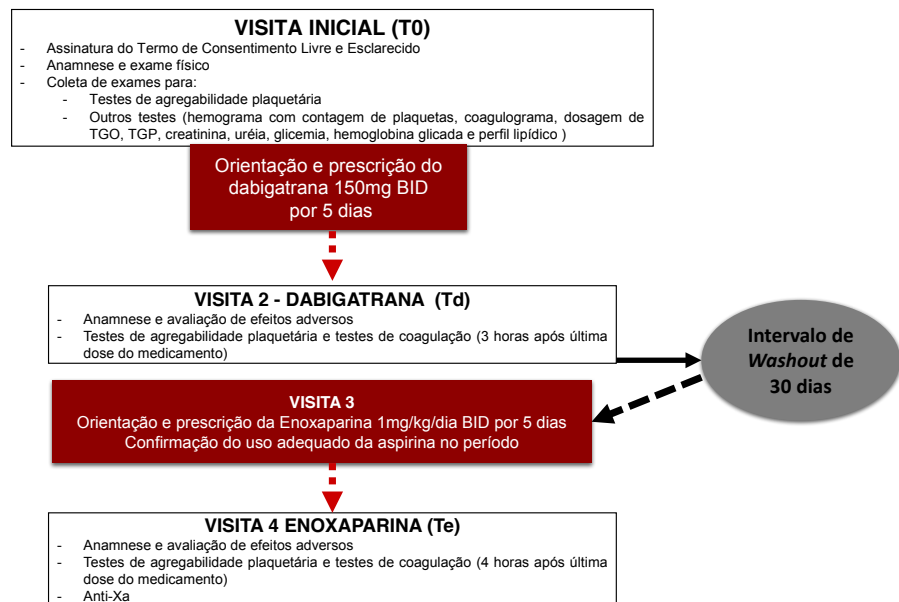


Figura 4 - Fluxograma de visitas e procedimentos do estudo.

Legenda: Os valores dos testes de cada fase foram denominados T0 (basal), Td (após dabigatrana) e Te (após enoxaparina). BID: 12/12horas;

A dabigatrana foi fornecida em comprimidos de 150mg, a serem utilizados por via oral de 12/12 horas.

A enoxaparina foi utilizada na dose de 1mg/kg, por via subcutânea a cada 12 h., salvo em pacientes acima de 75 anos, quando a dose foi diminuída para 0,75 mg/kg de 12/12 h. Todos os pacientes foram orientados quanto à técnica de aplicação do medicamento e receberam a primeira dose pelo investigador durante a visita 3.

Para avaliação de aderência foi fornecido uma tabela de checagem aos pacientes, além de orientado que os mesmos trouxessem as cartelas e seringas para contagem final da medicação. Os pacientes receberam a dose exata de Dabigatrana e Enoxaparina para uso durante 5 dias (10 doses de cada medicação), considerando-se a estabilidade da dabigatrana em torno de 3

dias adicionados 2 dias por adequação temporal em relação aos finais de semana.

3.2.4 Descrição sucinta dos principais testes laboratoriais

a. **Agregometria de sangue total por Impedância elétrica pelo método Multiplate[®] (Multiple Electrode Aggregometry – Roche Diagnostics) - MEA:** técnica que mede a agregometria do sangue total pela avaliação da impedância elétrica entre dois eletrodos imersos no sangue total, 5 minutos após a adição de um agonista. O aumento da impedância se correlaciona com a quantidade de agregados plaquetários que se depositam nos eletrodos após a adição do agonista. À medida que a reação ocorre, é desenhado um gráfico da impedância elétrica conforme o tempo da reação, de modo que a agregometria é avaliada pela área sob a curva (AUC), onde quanto maior a AUC, maior a agregabilidade para o reagente utilizado. A agregabilidade plaquetária foi iniciada utilizando ácido araquidônico (ASPItest, 0,5 mM), ou peptídeo ativador do receptor de trombina (MEA-TRAP-6, TRAPtest, 32 μ M) utilizando reagentes fornecidos pelo fabricante (Dynabyte, Munique, Alemanha). O aumento da impedância devido à fixação das plaquetas nos eletrodos foi continuamente medido para cada unidade de sensor durante um período de 6 minutos. Os dados foram transformados em unidade arbitrária (UA) e traçados como duas curvas de agregabilidade separadas em função do tempo. A agregabilidade medida por MEA foi quantificada como a área sob a curva de agregabilidade (AUC, [AU * min]). Alternativamente, o software do analisador permite a expressão de valores de

AUC em [U], onde 10 [AU * min] correspondem a 1 [U], unidade usada no presente trabalho. Valores abaixo de 40U indicam inibição adequada da COX-1 pela aspirina no ASPItest.⁵⁵

b. **Agregometria óptica:** realizado em plasma rico em plaquetas, preparado por centrifugação de amostras de sangue a 250 x g por 10 min. Estudos de agregação foram realizados por agregômetro Chrono-log[®] óptico (Chrono-log[®] Corporation, EUA), utilizando como agonistas 5µM de ADP e epinefrina.

c. **VerifyNowAspirin[®] (VFN) (Accumetrics, Inc., San Diego, California, USA):** utiliza o ácido araquidônico como agonista para avaliação da agregabilidade plaquetária por meio de detecção óptica. Alíquotas das amostras de sangue total são colocadas em cartuchos contendo uma preparação padrão liofilizada de fibrinogênio e ácido araquidônico. À medida que a agregação ocorre, o sistema converte a luminosidade transmitida em Unidades de Reação à aspirina (URA). Quanto maior a agregação maior o resultado em URA. Valores >550 URA indicam resistência ao AAS pelo VFN Aspirin[®] > 550 URA.⁵⁶

d. **ReoRox[®] (MediRox AB):** tromboelastograma que avalia propriedades viscoelásticas do sangue sob condições de baixo cisalhamento. Usa-se uma cubeta em que se acrescenta uma amostra de sangue total de 0,36 mL que oscila com um ângulo de 4° 45'. Cada rotação dura 10". Um pino é suspenso na amostra de sangue por um fio de torção e é monitorado para movimento. O torque da cubeta é transmitida ao pino imerso após a agregabilidade plaquetária ter ocorrido, ligando a cubeta ao pino. A força da ligação das plaquetas com a fibrina afeta a magnitude do movimento dos pinos.

O resultado é, portanto, diretamente relacionado à força do coágulo formado. Com a retração e lise do coágulo, os laços entre fibrina e plaquetas são quebrados e a transferência de movimento diminui. O movimento de rotação do pino é convertida de sinais eletromecânicos para um sinal elétrico que é exibido como um traçado. O gráfico formado fornece as seguintes informações:

- tempo de coagulação (TC), isto é, o período desde o início da análise até o início reconhecível da formação de coágulos;
- tempo de formação do coágulo (TFC), isto é, o intervalo de tempo desde o início da formação do coágulo até se atingir uma amplitude de 40 mm;
- ângulo alfa (SLOPE), isto é, o ângulo entre a linha central e uma tangente à curva através do ponto de amplitude de 20 mm;
- máxima firmeza do coágulo (MCF), que corresponde à amplitude máxima da curva registrada.

e. **Tromboxano B2 sérico:** 4 ml do sangue total no tubo com citrato de sódio a 3.2% foi centrifugado e incubado a 37°C por 2 horas e depois congelado a 80°C negativos. Posteriormente as amostras foram analisadas através do método ELISA[®]. O TXB2 é o principal metabólito inativo do TXA2 no plasma, assim como o 11-dehydro TXB2 é o principal metabólito urinário. Avalia, portanto, uma via final comum da agregabilidade plaquetária e detecta indiretamente a inibição da COX-1 pela aspirina. A dosagem do TXB2 sérico e a do 11-dehydro TXB2 urinário podem ser feitos pelo método ELISA[®].

f. **Proteína C reativa ultrasensível:** quantificada por meio de anticorpos monoclonais, pelo método de imunonefelometria de detecção ultrasensível em equipamento automatizado BN II Systems, utilizando o kit

CARDIO PHASE hs CRP (Siemens *Healthcare Diagnostics Products*, Marburg, Alemanha).

g. **Interleucina-6:** amostras de sangue total em tubo com CS a 3,2% foram centrifugadas a 300rpm, sendo coletadas alíquotas de soro e depois congeladas a 80°C negativos. Posteriormente, a IL-6 foi determinada no soro dos pacientes com a utilização do método de quimiluminescência (ensaio imunométrico sequencial de fase sólida, de enzimas químico-luminosas), utilizando o aparelho IMMULITE 1000 (Siemens Healthcare, Llamberis, Gwynedd, Inglaterra). A sensibilidade do teste é de 2 pg/mL.

3.3 Análises estatísticas

3.3.1 Cálculo amostral

Considerando uma diferença entre as drogas de 34% no valor de agrega plaquetária e uma dispersão de 20%, erro $\alpha=0,05$ e poder de 80%, o tamanho da amostra é de 28 pacientes, acrescentado-se 10% para eventuais perdas.⁴⁰

3.3.2 Análise Estatística

Variáveis quantitativas foram avaliadas em relação à sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal são representadas por média e desvio padrão e comparadas pelo teste T de

Student Pareado. Dados não paramétricos são representados por mediana e percentis (25-75) e comparados pelo Teste de Wilcoxon.

Para as variáveis qualitativas (categóricas) foi desenvolvido estudo descritivo estimando as proporções de cada categoria. A correlação entre tais variáveis foi realizado por meio do coeficiente de correlação de *Spearman*. A análise de interação entre subgrupos pré-especificados foi realizada por regressão logística.

Os valores de $p < 0,05$ (bicaudal) foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado nas análises estatísticas foi o SPSS 24.0 (Microsoft, Chicago, EUA).

3.4 Financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2012/11750-8. Não houve qualquer participação da fonte patrocinadora no desenho, execução ou análise estatística dos resultados obtidos.

3.5 Questões Éticas

Este protocolo está de acordo com as recomendações contidas na declaração de Helsinki e foi aprovado, juntamente com o TCLE, pela Comissão Científica do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina da USP, antes do início do estudo.

4. Resultados

4.1 Seleção dos pacientes

No período de agosto de 2013 a abril de 2015 foram analisados randomicamente 86 prontuários eletrônicos de pacientes selecionados a partir dos bancos de dados da Unidade de Coronariopatia Aguda do InCor/HCFMUSP, conforme critérios de inclusão e exclusão. Desses, 55 foram excluídos por não contemplarem os critérios de inclusão, 6 se negaram a participar do estudo e 18 apresentavam dados incompletos no prontuário que não permitiam contato com os mesmos. Foram então incluídos no total 31 pacientes, tendo havido duas exclusões após a visita inicial (basal) devido a plaquetopenia e doença renal crônica com TFG < 40 mL/min/1,73m². Tais critérios de inclusão não faziam parte da história médica conhecida dos pacientes durante a visita 1 (Figura 5).

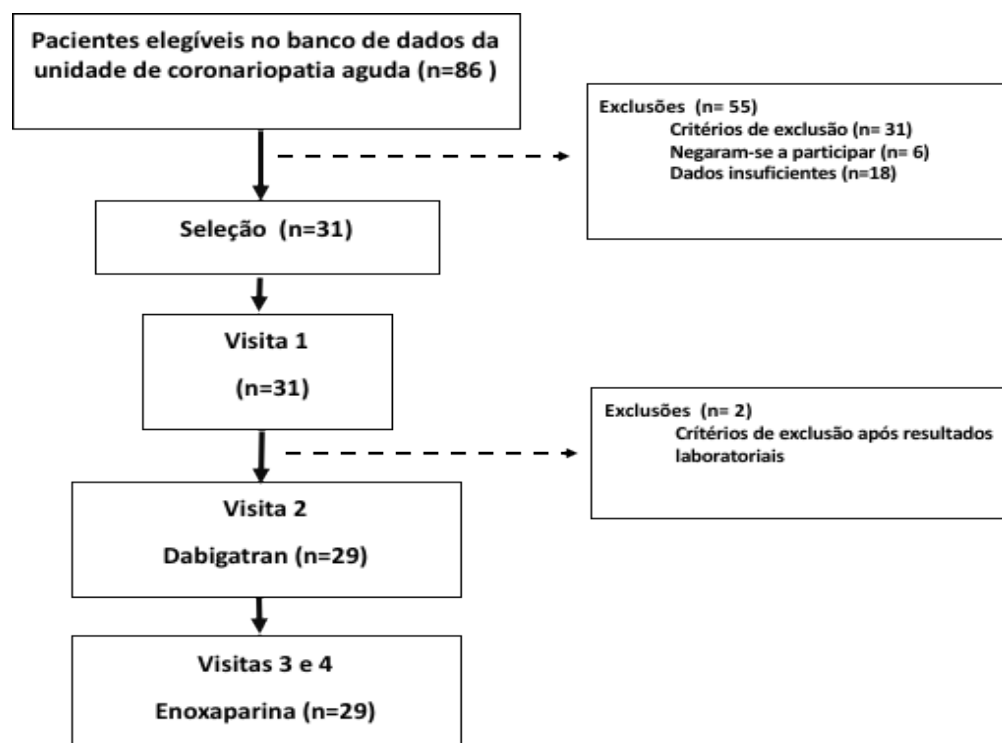


Figura 5 - Fluxograma de seleção dos pacientes.

4.2 Características basais da população

As características basais da população incluída na presente análise estão sumarizadas na tabela 3. A idade média dos pacientes foi de 63 anos (sendo 69% do sexo masculino), e apresentavam IMC médio de 29 kg/m². Em relação aos antecedentes médicos, hipertensão estava presente em 79,3%, dislipidemia em 86,2%, e diabetes em 48%. Setenta e cinco por cento dos pacientes relatava história pregressa de angioplastia e 27% de cirurgia de revascularização. As medicações de uso prévio também estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Características basais dos pacientes na visita 1

Variável	Pacientes (n=29)
Características gerais	
Gênero masculino (%)	20 (69,0%)
Idade* (anos)	63 ± 8
IMC* (kg/m²)	29 ± 4
PAS* (mmHg)	130,0±25
PAD[†] (mmHg)	80 (70-90)
FC* (bpm)	65 ± 8
História Médica	
DRC (%)	4 (13,8%)
DM (%)	14 (48,3%)
HAS (%)	23 (79,3%)
DLP (%)	25 (86,2%)
Tabagismo (%)	11 (37,9%)
ICP prévia (%)	22 (75,9%)

Tabela 3 - Características basais dos pacientes na visita 1 (Continuação)

CRM prévia (%)	8 (27,6%)
IAMCEST (%)	13 (44,8%)
IAMSSST (%)	16 (55,2%)
AI (%)	7 (24,1%)
Tabela 3 (continuação)	
Resultados de exames laboratoriais	
HbA1c[†] (%)	6,2 (5,9 - 7,5)
Hemoglobina[†] (g/dL)	14,6 (14,4-15,8)
Leucócitos*/mm³	7128 ± 1750
Plaquetas/mm³	220000 ± 58000
Creatinina* (mg/dL)	1,06 ± 0,23
Uréia[†] (mg/dL)	34 (29-38)
ALT[†] (mg/dL)	35 (28-44)
AST[†] (mg/dL)	24 (20-28)
Glicose[†] (mg/dL)	114 (108-137)
Colesterol[†] (mg/dL)	147 (124-178)
HDL* (mg/dL)	39,79 ± 10,95
LDL[†] (mg/dL)	75 (59-110)
Triglicérides[†] (mg/dL)	111 (103-205)
Medicamentos	
Estatina (%)	29 (100%)
Betabloqueador (%)	26 (89,7%)
IECA (%)	19 (65,5%)
Metformina (%)	12 (41,4%)
Insulina (%)	6 (20,7%)

Legendas: IMC- índice de massa corpórea, PAS- pressão arterial sistólica, PAD- pressão arterial diastólica, FC- frequência cardíaca, DM- Diabetes Mellitus, HAS- hipertensão arterial sistêmica, DRC- doença renal crônica (TFG <60 ml/min^{1,73m²}), DLP- dislipidemia, ICP- intervenção coronária percutânea, CRM- cirurgia de revascularização miocárdica, IAMCEST – infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST; IAMSSST- infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST, AI- angina instável, HbA1c- hemoglobina glicada, ALT – alanina aminotransferase, AST – aspartato aminotransferase; LDL- lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein); HDL- lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein); IECA- Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

* média e desvio padrão; † mediana e percentis 25/75

Quanto aos exames laboratoriais, os resultados das análises hematómicas estavam dentro da normalidade. A média da hemoglobina foi de 14,6g/dL e de plaquetas 220.000/mm³. Os parâmetros de função renal utilizados (uréia e creatinina) mostraram valores de 34(29-38)mg/dL (mediana) e de 1,06 ± 0,23mg/dL (média), respectivamente. O perfil lipídico mostrou valores próximos às metas de controle, visto que 100% da população referia uso de estatinas.⁵⁷

A mediana de hemoglobina glicada foi de 6,2%, sendo que 20% dos pacientes eram insulino dependentes.

4.3 Comparação da agregabilidade plaquetária entre os grupos dabigatrana e enoxaparina

a) Objetivo principal do estudo- Agregabilidade plaquetária pelo MEA-ASPI

a.1) Como se nota na figura 6, em comparação com o basal a dabigatrana aumentou a agregabilidade em 5U±24,1 e a enoxaparina diminuiu a agregabilidade plaquetária em 6U ± 22,2 (p=0,012, IC 95% 2,4 a 18,1).

b) Objetivos secundários do estudo

b.1) Respostas individuais- Agregabilidade plaquetária pelo MEA-ASPI:

b.1.1) À dabigatrana: apesar do aumento numérico na média da agregabilidade plaquetária com o uso da dabigatrana, a diferença em relação ao basal não foi significativa (Figura 7).

b.1.2) À enoxaparina: ao contrário do observado com o uso da dabigatrana, notou-se diminuição numérica (porém também não significativa) na média da agregabilidade plaquetária com o uso da enoxaparina (Figura 7) .

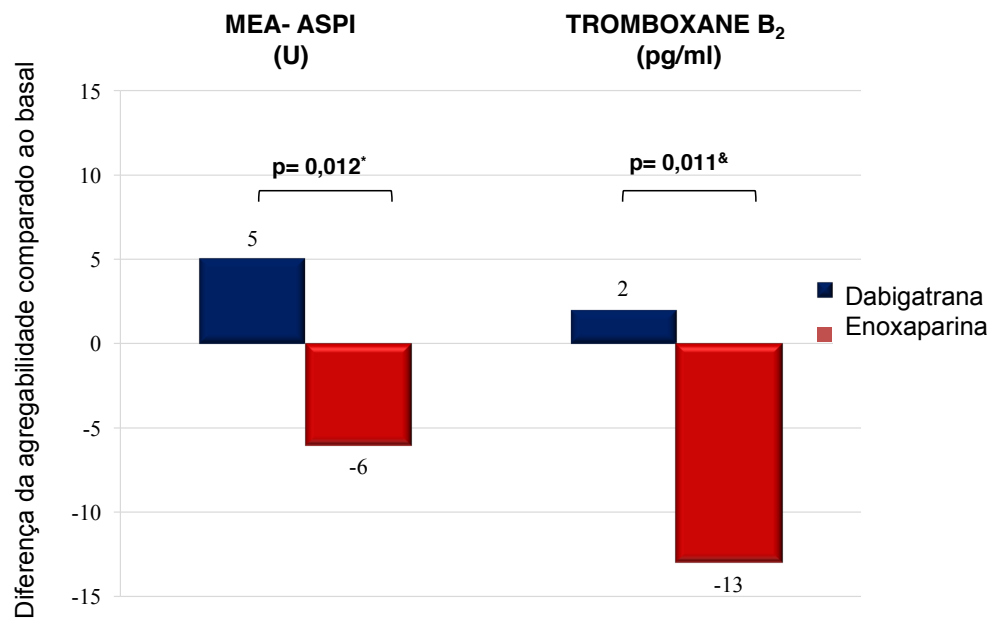


Figura 6 - Diferença da agregabilidade plaquetária em relação aos valores basais de acordo com o uso da dabigatrana ou da enoxaparina. *teste T-Student pareado; &teste de Wilcoxon

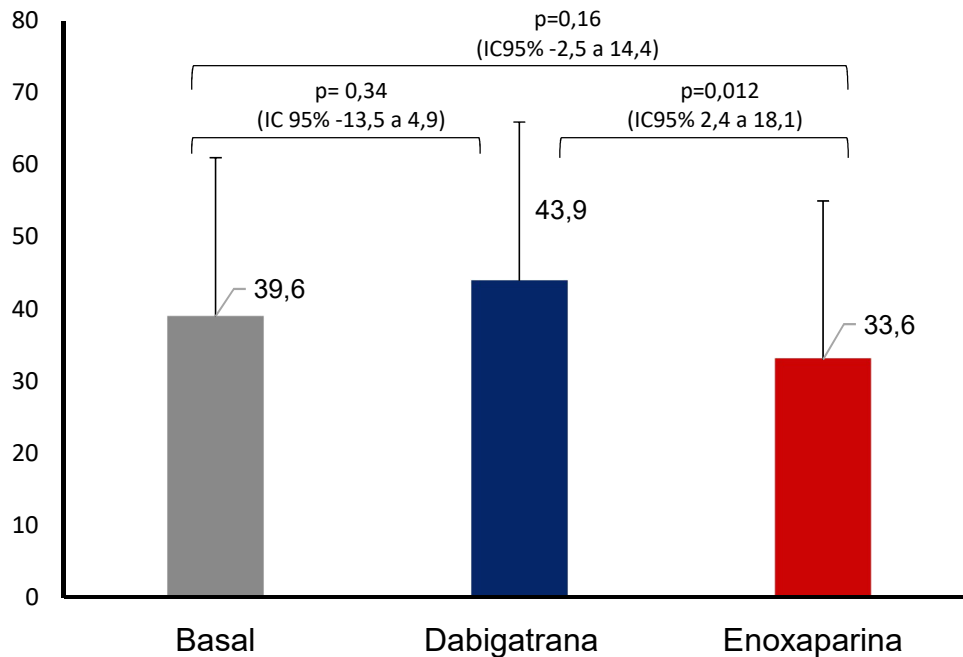


Figura 7 - Resultados da agregabilidade plaquetária pelo **Multiplate® Aspirin (U)**: valores médios basal e após o uso da dabigatran e da enoxaparina.

b.2) Agregabilidade plaquetária pelos demais testes- TXB2

b.2.1) Como se nota na figura 6, em comparação com o basal a dabigatran aumentou a mediana da agregabilidade plaquetária pelo TXB2 em 2 pg/mL, e a enoxaparina diminuiu a mesma em 13 pg/mL ($p=0,026$).

Não havia diferença significativa entre o grupo dabigatran quando comparado individualmente com o valor basal pelo TXB2; porém ao final do seguimento, o grupo dabigatran apresentou agregabilidade plaquetária média significativamente maior do que o grupo enoxaparina ($p=0,026$). Ainda, isoladamente a enoxaparina diminuiu significativamente a agregabilidade plaquetária pelo TXB2 quando comparada aos valores basais.

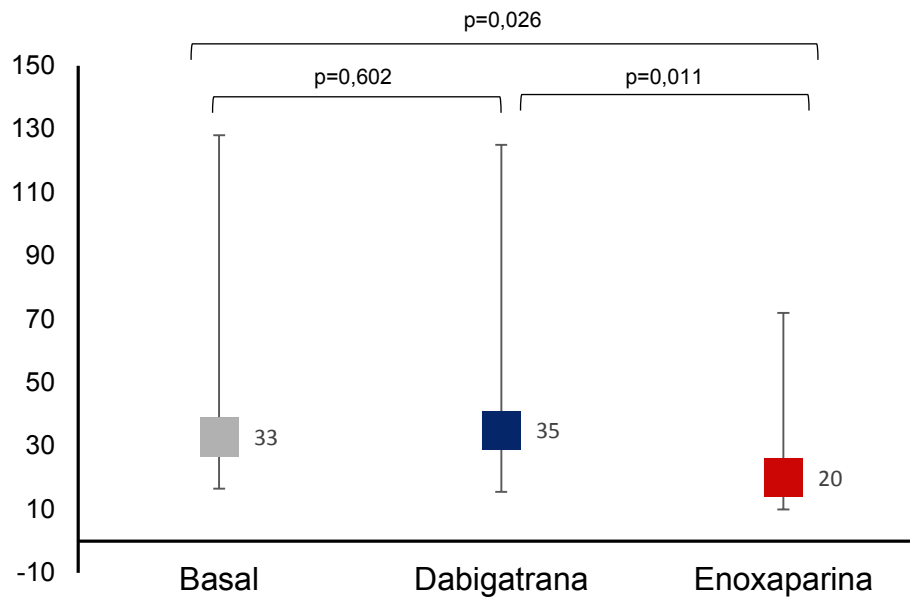


Figura 8 - Resultados da agregabilidade plaquetária pelo Tromboxano B2 (pg/ml): valores de mediana basal e após o uso da dabigatрана e da enoxaparina.

b.3) Agregabilidade plaquetária por outros testes

Como se nota na Tabela 4, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos dabigatрана e enoxaparina, apesar de diminuição estatisticamente significativa nos valores da agregabilidade plaquetária quando analisada a resposta à enoxaparina isoladamente pelo método de agregometria optica utilizando ADP como agonista.

Tabela 4 - Testes plaquetários: comparação entre Dabigatрана e Enoxaparina

Teste	Basal	Dabigatрана	Enoxaparina	p		
				T0-Td	T0-Te	Td-Te
MEA-ASPI*	39,6 ± 21	43,9 ± 24	33,6 ± 22	0,345	0,160	0,012
TXB2	33 (16,5 - 95)	35 (19,5 - 90)	20 (10 - 52)	0,602	0,026	0,011
VFN*	543 ± 73	544 ± 75	530 ± 60	0,375	0,290	0,231
MEA-TRAP*	102 ± 26	102 ± 22	105 ± 39	0,746	0,766	0,728
AO ADP[†]	81 (76 - 86)	82 (76 - 86)	79 (74 - 85)	0,804	0,033	0,103
AO Adrenalina*	48 ± 27	47 ± 25	49 ± 20	0,888	0,778	0,641

Legendas: VFN: *VerifyNow*[®], MEA: *Multiplate*[®] (Multiple Electrode Aggregometry); AO: agregometria ótica; TXB2: tromboxano B2; Td: dabigatрана; Te: enoxaparina, T0: basal * média e DP[†] mediana e (p25-p75)

b.3) Avaliação da coagulação e cinética do coágulo

Como se nota na Tabela 5, a avaliação do coagulograma mostra que houve aumento significativo no valor de mediana do RNI (razão de normatização internacional) no grupo dabigatрана em relação ao grupo enoxaparina [1,3 (1,2 - 1,5) *versus* 1(1,0 - 1,1), p<0,001].

Foi observado, ainda, aumento na média da relação do tempo de tromboplastina ativado (RTPA), tanto no grupo dabigatрана (1,95 ± 0,5) quanto no grupo enoxaparina (1,35 ± 0,18), quando comparados ao grupo basal (1,01 ± 0,11, p<0,001), com ausência de diferenças significativas entre os grupos dabigatрана e enoxaparina (Figura 9). O valor dosado de anti-Xa após o uso da

enoxaparina estava dentro da faixa terapêutica estimada pelo laboratório local ($1 \pm 0,39$).

Tabela 5 - Resultados do coagulograma pelo RNI e RTPA: valores basal e após o uso da dabigatrana e da enoxaparina.

Teste	Basal	Dabigatrana	Enoxaparina	p		
				T0-Td	T0-Te	Td-Te
RNI [†]	1	1,3 (1,2 - 1,5)	1 (1,0 - 1,1)	p<0,001	0,071	p<0,001
RTPA*	1,01 ± 0,11	1,95 ± 0,5	1,35 ± 0,18	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Td: dabigatrana; Te: enoxaparina, T0: basal; * média e DP[†] mediana e (p25-p75)

Além disso, quando avaliados quanto à cinética do coágulo, os pacientes do grupo dabigatrana apresentaram aumento no tempo de coagulação e no tempo de formação de coágulo; já o grupo enoxaparina apresentou aumento significativo na máxima firmeza do coágulo, porém dentro dos valores de referência para normalidade (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação da cinética do coágulo

ROTEM	Basal (média ± DP)	Dabigatrana (média ± DP)	Enoxaparina (média ± DP)	p		
				T0-Td	T0-Te	Td-Te
TC	31 ± 8	95 ± 35	30,7 ± 8	<0,001	0,741	<0,001
TFC	87 ± 22	175 ± 51	80 ± 21	<0,001	0,159	<0,001
SLOPE	129 ± 78	133 ± 62	131 ± 61	0,25	0,93	0,880
MFC	1707 ± 491	1796 ± 386	1999 ± 527	0,377	0,020	0,027

Legendas: TC: tempo de coagulação (valor normal (VN): 24 a 54seg); TFC: tempo de formação do coágulo (VN: 61 a 139 seg); MFC: máxima firmeza do coágulo (VN: 1039 a 2825 Pa); Td: dabigatrana; Te: enoxaparina, T0: basal

b.4) Correlação entre o objetivo primário do estudo e marcadores inflamatórios

Os marcadores inflamatórios dosados foram a PCR ultrasensível e a IL-6. Quando se comparou os valores após o uso de dabigatrana e de enoxaparina houve diferença estatisticamente significativa apenas após enoxaparina em relação aos valores basais para IL-6 (Tabela 6).

Tabela 7 - Comparação dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-6)

Testes	Basal	Dabigatrana	Enoxaparina	p		
				T0-Td	T0-Te	Td-Te
IL-6	1,93 (0 - 6,8)	1,82 (0 - 4,6)	0,73 (0 - 15)	0,084	0,009	0,078
PCR us	0,99 (0-3)	1,11 (0,4 - 3,2)	1,35 (0,1- 18,6)	0,387	0,466	0,439

Legendas: interleucina 6; PCR us: proteína C reativa ultrasensível. Medianas (p25-75); Td: dabigatrana; Te: enoxaparina, T0: basal

Ademais, quando se analisou a variação dos marcadores inflamatórios e dos testes de agregabilidade após as medicações, não foi encontrada correlação entre IL6 e/ou PCRus relacionada à intervenção do estudo em relação ao objetivo principal (agregabilidade plaquetária via MEA-ASPI) (Tabela 7).

Tabela 8 - Correlação entre a variação dos marcadores inflamatórios e do MEA-ASPI após dabigatran e após enoxaparina.

		MEA-ASPI		
		Basal	Dabigatran	Enoxaparina
PCR us T0	r_s	-0,160	-0,121	0,028
	p	0,339	0,534	0,883
IL-6 T0	r_s	-0,94	-0,250	0,036
	p	0,629	0,190	0,855
PCR us Td	r_s	-0,054	0,044	0,134
	p	0,104	0,821	0,487
IL-6 Td	r_s	-0,266	-0,177	0,121
	p	0,163	0,359	0,530
PCR us Te	r_s	-0,200	-0,247	0,064
	p	0,421	0,197	0,740
IL-6 Te	r_s	-0,007	-0,326	0,129
	p	0,970	0,085	0,505

Legendas: PCR us: proteína C reativa ultrasensível; IL-6: interleucina-6; p: valor de p; rs: coeficiente de Spearman. Td: dabigatrana; Te: enoxaparina, T0: basal

b.5) Análise de subgrupos e maus respondedores à aspirina

Foram analisados três subgrupos pré-especificados (diabéticos e não diabéticos, idade ≥ 65 ou < 65 anos e sexo feminino ou masculino) em relação ao objetivo primário, considerando valores MEA-ASP $> 40U$ (maus responderores à aspirina) nos grupos dabigatrana e enoxaparina. Os três grupos apresentaram proporções equivalentes de maus respondedores (basal 41,4%, versus 51,7% dabigatrana, $p=0,72$; basal 41,4% versus 27,6% enoxaparina, $p=0,56$; e dabigatrana 51,7% versus 27,6% enoxaparina, $p=0,17$.) Como se nota na figura 10, apesar de numericamente haver um maior risco

com o uso do dabigatran nos pacientes do sexo feminino, idosos e diabéticos, nenhum dos valores de p-interação atingiram valor estatisticamente significativo.

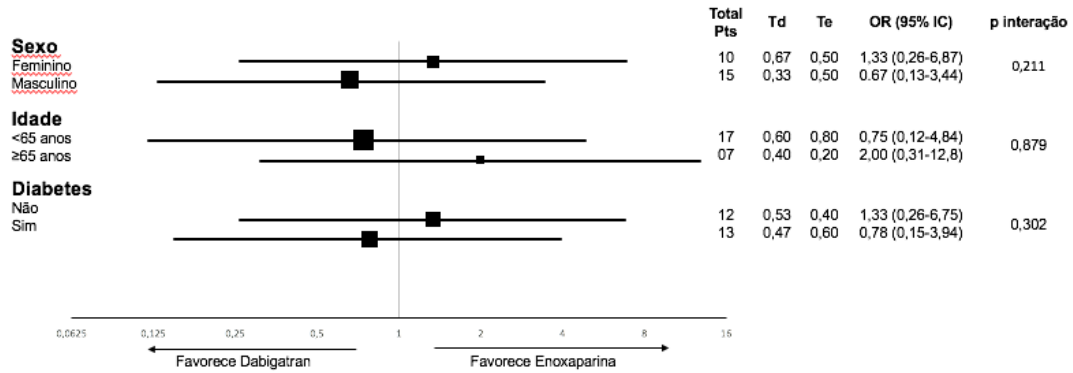


Figura 9 - Análise de subgrupos em relação à valores de MEA-ASPI > 40U.
 Legenda: Td: dabigatran; Te: enoxaparina

5. Discussão

No presente estudo, diferenças significativas foram observadas quanto à resposta da dabigatrana e da enoxaparina em relação à agregabilidade plaquetária, com melhor perfil sendo demonstrado para a enoxaparina, tanto pelo método MEA-ASPI (meta principal do estudo), quanto pelo método do TXB2.

Quando analisados de forma individual, nossos achados não mostraram diferenças significativas na agregabilidade plaquetária induzida pela dabigatrana em relação aos valores basais. Esses dados vêm ao encontro de publicações mais recentes que, ao contrário das evidências anteriormente comentadas^{17,47,49}, sugerem segurança do uso da dabigatrana em pacientes portadores de SIMI.^{58,59}

Isso ocorre pois o uso concomitante de antiagregantes plaquetários com a dabigatrana parece neutralizar seu possível efeito protrombótico. Estudo recente mostrou que, quando associado ao clopidogrel, o efeito antiplaquetário do AAS, monitorado pela agregabilidade plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, não foi afetado pelo uso da dabigatrana ou da rivaroxabana.⁶⁰ Esse achado é compatível com outros estudos que avaliaram o efeito sobre a reatividade plaquetária e a cinética do coágulo resultante do uso conjunto da dabigatrana com DAPT. Neles, não foram observadas diferenças significativas na atividade plaquetária, tampouco na estrutura do coágulo, após o uso da dabigatrana.^{61,62}

No cenário clínico, recentemente o estudo RE-DUAL PCI avaliou a terapia antitrombótica dupla com dabigatrana e um inibidor P2Y12 versus

terapia tripla com varfarina mais DAPT em pacientes com fibrilação atrial não valvular que foram submetidos à ICP. O desfecho composto secundário de eficácia para eventos tromboembólicos não mostrou diferença entre os grupos de terapia, sugerindo que o tratamento antiplaquetário sinérgico pode superar o possível efeito ativador de plaquetas da dabigatrana.⁶³

Adicionalmente, nossos achados demonstraram redução estatisticamente significativa nos níveis de TXB2 após exposição à enoxaparina, tanto em relação aos valores basais quanto àqueles após o uso da dabigatrana. Essa possível ação protetora da enoxaparina, poderia ser explicada pelo seu bloqueio de outros fatores de coagulação, além da trombina, contribuindo para o efeito antitrombótico mais adequado. No entanto, pouco se sabe ainda sobre o possível efeito antiagregante plaquetário da enoxaparina.^{40,64,65}

Estudos realizados em diferentes cenários, incluindo pacientes submetidos a intervenção coronariana percutânea, mostraram atenuação da reatividade plaquetária pela HBPM, quando comparada à HNF.^{66,67} Aggarwal e cols. avaliaram a atividade plaquetária em pacientes coronariopatas, por meio da ativação da Gp IIb/IIIa, utilizando citometria de fluxo. Os autores observaram diminuição dos parâmetros avaliados em sangue tratado com HBPM quando comparado à HNF, sugerindo via adicional de inibição à agregabilidade plaquetária pela enoxaparina.⁶⁷

Do ponto de vista clínico, uma metanálise que incluiu, entre outros, estudos que compararam a enoxaparina contra a dabigatrana, não mostrou vantagem, do ponto de vista de incidência de eventos isquêmicos, com o uso da enoxaparina. A grande heterogeneidade nas doses do IDT usadas para

comparação (50 a 220mg/dia), no entanto, pode ter influenciado a neutralidade dessa análise.⁴⁹

No presente estudo, quando a função plaquetária induzida por trombina foi testada para dabigatrana e enoxaparina por meio do MEA-TRAP, não se observou diferença em relação aos valores basais. Recentemente, Olivier e cols. demonstraram aumento da agregabilidade plaquetária induzida pela TRAP-6 apenas como efeito dose-dependente, mais consistente após a exposição em longo prazo à dabigatrana. Isto pode ser explicado por uma alteração conformacional dos receptores de trombina na superfície das plaquetas causada por modificações na expressão do gene dos megacariócitos pela inibição crônica da trombina.⁶⁸ O fato dos nossos pacientes terem sido expostos ao medicamento por curto tempo poderia explicar a ausência de tais achados no presente material.

Os resultados encontrados em nosso estudo, no que se refere à resposta de diferentes variáveis do coagulograma ao uso da dabigatrana, são consistentes com a literatura: a dabigatrana prolonga o tempo de tromboplastina parcial ativado, o tempo de trombina, que avalia diretamente a atividade da trombina no plasma, e o tempo de coagulação do ecarin (ECT), que é um ensaio específico para geração de trombina.⁵

Em concentrações plasmáticas clinicamente relevantes, a dabigatrana tem também efeito sobre o tempo de protrombina e o RNI, relacionada à fase de propagação da anticoagulação.⁶⁹ No presente estudo observou-se aumento no RNI em pacientes que usaram dabigatrana, não evidenciado após o uso da enoxaparina.⁷⁰

Ambos os fármacos aqui estudados aumentaram o TTPa. O ponto de

vista amplamente aceito de que a HBPM não prolonga o TTPa nem sempre é correto e, quando ocorre, depende da sensibilidade do reagente e da concentração plasmática do fármaco. A enoxaparina não prolonga o TP.⁵

Em relação à cinética do coágulo, estudos recentes demonstraram que a dabigatrana aumenta o TC e o TFC em testes *in vitro*, o que é compatível com seu efeito inibitório sobre a trombina. A MFC e o ângulo (SLOPE) nestes estudos também foi menor do que nos controles. Esse achado sugere que a inibição da trombina pelo IDT também influenciaria a função plaquetária.⁷¹⁻⁷³

A avaliação da contribuição das plaquetas para a formação do coágulo geralmente é feita por meio da amplitude do coágulo (MFC no ReoRox®). De forma indireta, essa variável demonstra a força do trombo, a qual depende da interação da rede de fibrina e de plaquetas.⁷⁴ No presente estudo, o paradoxal aumento da MFC no grupo enoxaparina em relação ao basal e ao uso do dabigatrana, ainda que estatisticamente significativo, ocorreu dentro de valores considerados clinicamente normais.

A avaliação *in vitro* de diferentes doses de enoxaparina demonstrou, em estudo de Thomas e cols., aumento no TC e no TFC. Tais achados não foram replicados em nosso estudo, apesar do anti-Xa após o uso da enoxaparina estar comprovadamente dentro da faixa terapêutica.⁷⁵

Quanto à dabigatrana, nosso resultado foi consistente com estudo de Tsantes e cols. que avaliaram a viscoelasticidade em 19 indivíduos com FA em uso do anticoagulante e não observaram alterações nos parâmetros plaquetários.⁷⁶

Em relação aos fatores inflamatórios, a trombina tem sido implicada diretamente na inflamação relacionada à lesão endotelial: a ativação do PAR-1

mediada por ela induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1, IL-6, IL-8.^{77,78}

Dados de literatura sugerem que a inibição da trombina com dabigatrana leva a efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos na fibrose pulmonar induzida por medicamentos. Tais achados, entretanto, foram demonstrados com o uso prolongado de IDTs⁷⁹, o que talvez explique a ausência de correlação entre marcadores inflamatórios e agregabilidade plaquetária observada no presente estudo, em que o uso da dabigatrana se deu por curto período de tempo.

Por fim, considerando que pelo menos metade das mortes nos principais ensaios de anticoagulação por FA foram mortes de causa cardíaca, relacionadas à doença aterosclerótica coronariana⁸⁰; e que em torno de 40% dos pacientes nos grandes estudos de FA¹⁷ eram coronariopatas sendo que até 51,1% deles estavam em uso de aspirina,⁴⁸ a importância do presente estudo se dá, por conseguinte, pelo melhor entendimento da relação entre os anticoagulantes e antiagregantes plaquetários, especialmente a aspirina, associação cada vez mais comum em pacientes coronariopatas crônicos e portadores de FA. Por outro lado, nossos dados reforçam a propriedade de utilização da heparina em pacientes com coronariopatia aguda e/ou submetidos a ICP, mesmo quando em uso de dabigatrana.

5.1 Limitações do estudo

Os resultados do presente estudo devem ser interpretados considerando o tamanho amostral e as características específicas da

população composta por coronariopatas crônicos em uso de AAS.

Ademais, trata-se de um estudo mecanístico que avaliou desfecho substituto, de modo que não é possível fazer conclusões definitivas a respeito do impacto clínico dos achados aqui demonstrados.

Os nossos resultados com VFN e testes de viscoelasticidade devem ser vistos com cautela. Ensaio posteriores ao desenho e implementação do presente estudo, sugerem que a avaliação da agregabilidade plaquetária relacionada à COX-1 não deva ser realizada em tubos com citrato, por conterem quelantes do cálcio, importantes para geração de trombina.^{81,82}

Em relação ao método de avaliação da cinética do coágulo, o uso dos reagentes específicos e avaliação da elasticidade talvez pudessem fornecer dados mais fidedignos em relação à contribuição da plaqueta para a estabilidade do coágulo.⁸³

Por fim, nosso estudo não comparou a agregabilidade plaquetária com o nível plasmático de trombina por meio de testes específicos (teste de geração de trombina e potencial de trombina endógeno), o que seria interessante para elucidar a biodisponibilidade da trombina como fator determinante para os achados.⁸⁴

As técnicas supracitadas foram apenas recentemente descritas e/ou requeriam equipamento e treinamento específicos, não disponíveis no nosso serviço durante a realização desse estudo.

6. Conclusões

1. Objetivo primário: a avaliação da agregabilidade plaquetária pelo MEA-ASPI demonstrou resposta significativamente favorável à enoxaparina, em relação à dabigatrana.
2. Objetivos secundários:
 - a. Análises dos medicamentos individualmente demonstram que, em relação aos valores basais, a enoxaparina diminuiu significativamente a agregabilidade plaquetária pelos métodos TXB2 e Agregometria optica com ADP. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas em relação à agregabilidade plaquetária quando do uso da dabigatrana versus valores basais.
 - b. Houve resposta similar à obtida no objetivo primário (superioridade da enoxaparina em relação à dabigatrana) pelo teste do TXB2, mas ausência de diferenças significativas entre os grupos foi observada pelos outros testes de agregabilidade plaquetária utilizados.
 - c. Tanto a dabigatrana quanto a enoxaparina aumentaram de forma significativa o RNI e o RTPA em relação aos seus respectivos valores basais, e esse aumento foi significativamente mais pronunciado no grupo dabigatrana, quando comparado ao grupo enoxaparina. Adicionalmente, o grupo dabigatrana aumentou de forma significativa os valores de TC e de TFC obtidos pelo tromboelastograma, em relação à enoxaparina.
 - d. Houve diminuição significativa nos valores de IL-6 quando do uso da enoxaparina, mas não com o uso do dabigratan. Não houve alterações significativas nos valores de PCRus com nenhum dos dois compostos.

- e. A análise das incidências de maus respondedores à aspirina nos grupos dabigatrana e enoxaparina não mostrou diferenças significativas no global da população analisada e tampouco foram demonstradas interações significativas entre os resultados obtidos e os subgrupos pré-especificados de pacientes do sexo masculino ou feminino, idosos ou não, com ou sem diabetes.

7. Anexos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: EFEITO DOS ANTICOAGULANTES SOBRE A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA: AÇÃO DA HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR (ENOXAPARINA) E DO INIBIDOR DIRETO DA TROMBINA (DABIGATRANA).

A) DADOS DO PESQUISADOR EXECUTANTE:

PESQUISADOR : Flávia Bittar Britto Arantes
CARGO/FUNÇÃO: Médica
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 147165- CRM-SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Coronariopatia Aguda - Instituto do Coração- FM-USP

B) DADOS DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

PESQUISADOR: Dr José Carlos Nicolau
CARGO/FUNÇÃO: Diretor UCCA
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 21038/SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Coronariopatia Aguda - Instituto do Coração- FM-USP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – Informações sobre a finalidade do estudo: Pacientes como o(a) senhor(a), que tem história de infarto ou angina (dor no peito), tem indicação de utilizar medicamentos que atuam na coagulação do sangue, como por exemplo a aspirina. Mesmo com o tratamento com este medicamento ainda existe um risco aumentado de desenvolver novos episódios de angina ou infarto, além de arritmia cardíaca como a fibrilação atrial, e nestes casos está indicado o tratamento associado com o uso de anticoagulantes. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que irá avaliar o efeito sobre a coagulação de duas medicações usadas como anticoagulantes nestas situações, em pacientes como o senhor(a).

2 – O que acontecerá se eu participar deste estudo e como são os procedimentos?

Caso aceite participar do estudo, pediremos que leia e assine esse termo de consentimento livre e esclarecido. Depois de assinar esse termo, o(a) Sr(a) será submetido aos seguintes procedimentos:

- Na primeira etapa do estudo será coletado sangue para realização de exames laboratoriais.
- Na segunda etapa do estudo os pacientes serão divididos em dois grupos : um grupo receberá primeiro o medicamento Dabigatran (comprimidos - via oral) 1 comprimido de 12 em 12 horas por 5 dias e o outro grupo receberá o medicamento Clexane (solução injetável – via subcutânea) de 12 em 12 horas por 5 dias. Ao completar os cinco dias de tratamento serão repetidos os mesmos exames laboratoriais.
- Após 30 dias será iniciada a terceira e última etapa do estudo em que os pacientes que receberam inicialmente o medicamento Dabigatran, irão receber Clexane , e os pacientes do grupo que recebeu inicialmente o medicamento Clexane receberão Dabigatran, também por 5 dias, e ao final do estudo será realizada nova coleta de exames laboratoriais.

3- Como serão realizados os procedimentos? Os Exames a serem realizados são coleta de sangue por punção da veia do antebraço; realização de hemograma com contagem de plaquetas, creatinina, uréia, glicemia, colesterol e testes de coagulação. Caso os exames laboratoriais mostrem algumas alterações como anemia (Hemoglobina <10g/dL ou Hematócrito < 30%, Hematócrito >50%) , alterações nas plaquetas (

Plaquetas < 100.000/mm³ ou > 500.000/mm³) e insuficiência renal (clearance de creatinina < 40 ml/minuto) o participante não continuará no estudo e será orientado e encaminhado para avaliação clínica ambulatorial.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Os riscos dessa pesquisa são considerados BAIXOS. Nas coletas de sangue, você poderá sentir um rápido desconforto durante as picadas, e pode haver um hematoma no local, que é uma “mancha roxa” temporária, que costuma mudar de cor na evolução e desaparecer em cerca de 2 a 3 semanas. Muito raramente, pode ocorrer inflamação da veia puncionada, quando ocorre inchaço, vermelhidão e dor na região da picada, que melhoram com calor local e analgésicos. A coleta dos exames será realizada em jejum. O uso de anticoagulantes aumenta o risco de sangramento como formação de hematomas e sangramento digestivo

5 – Quais os benefícios da participação nesse estudo? Não há benefício direto para o participante durante a realização do estudo, entretanto no caso de ocorrência de novo infarto ou angina, ou caso o senhor(a) venha a apresentar arritmia cardíaca, teremos novos dados referentes a segurança e influência das medicações citadas sobre a coagulação sanguínea. A aceitação ou recusa em participar do presente estudo não modificará em nada o seu tratamento rotineiro.

6 – Quais procedimentos alternativos disponíveis? Não há procedimentos alternativos aos propostos no presente estudo. Você pode não aceitar participar, o que será respeitado plenamente pelos investigadores.

7 – Contatos do estudo: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Prof. Dr. José Carlos Nicolau, e a pesquisadora executante é a Dr^a. Flávia Bittar Britto Arantes, que podem ser encontrados na Av. Enéas Carvalho Aguiar, 44 2º andar, bloco 2, sala 12, Cerqueira César, ou nos telefones (11) 2661-5058/2661-1154. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br.

8 – Garantia à liberdade da retirada de consentimento: É garantida a você, a

9 qualquer momento, a possibilidade de deixar de participar do estudo. Não haverá, se você optar em retirar este termo de consentimento, qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

10 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de informação: Você poderá fazer perguntas sobre o estudo em qualquer momento, e você encontrará neste documento os números de telefone do médico do estudo, caso necessite de mais esclarecimentos. Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, e sobre os resultados dos seus exames que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Você não terá direito aos resultados dos exames dos outros participantes envolvidos no projeto, assim como nenhum outro participante terá acesso aos resultados dos seus exames;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

13 – Coleta e armazenagem de material para pesquisas científicas futuras:

Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Efeito dos anticoagulantes sobre a ativação plaquetária: ação da heparina de baixo peso molecular (Enoxaparina) e do inibidor direto da trombina (Dabigatran).**”

Eu discuti com o Dr José Carlos Nicolau/Dra Flávia Bittar Britto Arantes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

8. Referências

1. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*. 2008;141(6):757–63.
2. Duxbury B, Poller L. The oral anticoagulant saga: past, present, and future. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001;7:269–75.
3. Serrano Junior C, Fenelon G, Soeiro A, Nicolau J, Piegas L, Montenegro S. Diretrizes Brasileiras de Antiagregantes Plaquetários e Anticoagulantes em Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(3Supl.):1–93.
4. Nugent MA. Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10301–3.
5. Funk DMA. Coagulation assays and anticoagulant monitoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:460–5.
6. Bianchini P, Osima B, Parma B, Nader HB, Dietrich CP CB et al. . ractionation and structural features of two heparin with high antithrombotic, antilipemic and anticoagulant activities. *Arzneimittelforschung*. 35:1215–9.
7. Weitz JI. Low-Molecular-Weight Heparins. *N Engl J Med*. 1997;337(10):688–99.
8. Hirsh J, Raschke R. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004 Sep;126(3, Supplement):188S–203S.

9. Samsa G, DB M, LB G, Bonito A, Lux LJ, Witter DM, et al. Quality of Anticoagulation Management Among Patients With Atrial Fibrillation. *Arch Intern Med.* 2000;160(7):967–73.
10. Hohnloser SH. Stroke prevention versus bleeding risk in atrial fibrillation: A clinical dilemma. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(2):181–3.
11. Hess PL, Kim S, Fonarow GC, Thomas L, Singer DE, Freeman J V., et al. Absence of Oral Anticoagulation and Subsequent Outcomes Among Outpatients with Atrial Fibrillation. *Am J Med.* 2016;ahead of p.
12. Glader EL, Sjölander M, Eriksson M, Lundberg M. Persistent use of secondary preventive drugs declines rapidly during the first 2 years after stroke. *Stroke.* 2010;41(2):397–401.
13. Ogilvie IM, Newton N, Welner SA, Cowell W, Lip GYH. Underuse of Oral Anticoagulants in Atrial Fibrillation: A Systematic Review. *Am J Med.* 2010;123(7):638–45.
14. Magalhães L, Figueiredo M, Cintra F, Saad E, Kuniyoshi R, Teixeira R, et al. II Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106((4)Supl.):1–22.
15. Pollack C V, Reilly P a, Eikelboom J, Glund S, Verhamme P, Bernstein R a, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. *N Engl J Med.* 2015;373(6):511–20.
16. Siegal DM, Curnutte JT, Connolly SJ, Lu G, Conley PB, Wiens BL, et al. Andexanet Alfa for the Reversal of Factor Xa Inhibitor Activity. *N Engl J Med.* 2015;373(25):2413–24.

17. 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(12):1139–51.
18. Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran Etxilate. *Circulation*. 2011;123(13):1436–50.
19. Marcello DN, Saskia M, Büller HR. Direct Thrombin Inhibitors. *N Engl J Med*. 2005;353:1028–40.
20. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, A KA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost*. 2007;5(11):2178–85.
21. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. GISSI-2: a factorial randomised trial of alteplase versus streptokinase and heparin versus no heparin among 12,490 patients with acute myocardial infarction. *Lancet*. 1990;336(8707):65–71.
22. ISIS-3: a randomised comparison of streptokinase versus tissue plasminogen activator versus anistreplase and of aspirin plus heparin versus aspirin alone among 41,299 cases of suspected acute myocardial infarction. ISIS-3 (Third International Study of Inf. *Lancet*. 1992;339(8796):753–770.
23. An International Randomized Trial Comparing Four Thrombolytic Strategies for Acute Myocardial Infarction. The GUSTO-I Investigators. *N Engl J Med*. 1993;329(10):673–82.

24. Antman EM, Morrow DA, McCabe CH, Murphy SA, Ruda M, Sadowski Z, et al. Enoxaparin versus Unfractionated Heparin with Fibrinolysis for ST-Elevation Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2006;354(14):1477–88.
25. Théroux P, Ouimet H, McCans J, Latour J-G, Joly P, Lévy G, et al. Aspirin, Heparin, or Both to Treat Acute Unstable Angina. *N Engl J Med*. 1988;319(17):1105–11.
26. Ferguson J, Califf R, Atman E, et al. SYNERGY Trial Investigators. Enoxaparin vs unfractionated heparin in high-risk patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes managed with an intended early invasive strategy. *Jama*. 2004;292(1):45–54.
27. Alexander JH. 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(22):2877–85.
28. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand J-P, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2011;366(1):9–19.
29. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33(20):2569–619.
30. Roffi M, Valgimigli M, Bax JJ, Borger MA, Gencer B, Germany UL, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2015;(32):2999–3054.

31. Piegas L, Timerman A, Feitosa G, Nicolau J, Mattos L, Andrade M, et al. V Diretriz Da Sociedade Brasileira De Cardiologia Sobre Tratamento Do Infarto Agudo Do Miocárdio Com Supradesnível Do Segmento St. Arq Bras Cardiol. 2015;105(2):1–105.
32. Nicolau J, Timerman A, Marin-Neto J, Piegas L, Barbosa C, Franci A. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST (II edição, 2007) – atualização 2013/2014. Arq Bras Cardiol. 2014;102(3 Supl):1–61.
33. Oldgren J, Budaj A, Granger CB, Khder Y, Roberts J, Siegbahn A, et al. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: A randomized, double-blind, phase II trial. Eur Heart J. 2011;32(22):2781–9.
34. Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010;32(5):416–21.
35. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. Circ J. 2010;74(4):597–607.
36. Fernandez F, Guyen P, Van Ryn J, Ofosu F, Hirsh J, Buchanan M. Hemorrhagic doses of heparin and other glycosaminoglycans induce a platelet defect. Thromb Res. 43:491–495.
37. Westwick J, Scully M, Poll C, Kakkar V. Comparison of low molecular weight heparin and unfractionated heparin on activation of human platelets in vitro. Thromb Res. 1986;42:435–47.

38. Heinrich D, Gorg T, Schulz M. Effects of unfractionated and fractionated heparin on platelet function. *Haemostasis*. 1988;18(Suppl 3):48–54.
39. Ellison N, Edmunds L, Colman R. Platelet aggregation following heparin and protamine administration. *Anesthesiology*. 1978;48:65–8.
40. Xiao Z, Theróux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparison with low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation*. 1998;97(25):251–6.
41. Assadian A, Senekowitsch C, Hagmüller GW, Lax J, Hübl W. Effects of Enoxaparin and Unfractionated Heparin on Platelet Activity and Reactivity during Carotid Endarterectomy. *Vascular*. 2008 Jun 1;16(3):161–6.
42. Montalescot G, Bal-dit-Sollier C, Chibedi D, Collet J-P, Soulat T, Dalby M, et al. Comparison of effects on markers of blood cell activation of enoxaparin, dalteparin, and unfractionated heparin in patients with unstable angina pectoris or non–ST-segment elevation acute myocardial infarction (the ARMADA study). *Am J Cardiol*. 2003 Mar 29;91(8):925–30.
43. Anand SX, Kim MC, Kamran M, Sharma SK, Kini AS, Fareed J, et al. Comparison of Platelet Function and Morphology in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention Receiving Bivalirudin Versus Unfractionated Heparin Versus Clopidogrel Pretreatment and Bivalirudin. *Am J Cardiol*. 2007;100(3):417–24.
44. Connolly S, Ezekowitz M, Yusuf S, Reilly P, Wallentin L. Newly identified events in the RE-LY trial. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1875–6.

-
45. Hohnloser SH, Oldgren J, Yang S, Wallentin L, Ezekowitz M, Reilly P, et al. Myocardial ischemic events in patients with atrial fibrillation treated with dabigatran or warfarin in the RE-LY (Randomized evaluation of long-term anticoagulation therapy) trial. *Circulation*. 2012;125(5):669–76.
 46. Connolly SJ, Wallentin L, Ezekowitz MD, Eikelboom J, Oldgren J, Reilly PA, et al. The Long-Term Multicenter Observational Study of Dabigatran Treatment in Patients With Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2013;128:237–43.
 47. Clemens A, Fraessdorf M, Friedman J. Cardiovascular outcomes during treatment with dabigatran: comprehensive analysis of individual subject data by treatment. *Vasc Heal Risk Manag*. 2013;9:599–615.
 48. Dans AL, Connolly SJ, Wallentin L, Yang S, Nakamya J, Brueckmann M, et al. Concomitant use of antiplatelet therapy with dabigatran or warfarin in the randomized evaluation of long-term anticoagulation therapy (RE-LY) trial. *Circulation*. 2013;127(5):634–40.
 49. Douxfils J, Buckinx F, Mullier F, Minet V, Rabenda V, Reginster JY, et al. Dabigatran etexilate and risk of myocardial infarction, other cardiovascular events, major bleeding, and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3).
 50. Ezekowitz MD, Reilly PA, Nehmiz G, Simmers TA, Nagarakanti R, Parcham-azad K, et al. Dabigatran With or Without Concomitant Aspirin Compared With Warfarin Alone in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation (PETRO Study). *Am J Cardiol*. 2007;100:1419–1426.

51. Furugohri T, Sugiyama N, Morishima Y, Shibano T. Antithrombin-independent thrombin inhibitors, but not direct factor Xa inhibitors, enhance thrombin generation in plasma through inhibition of thrombin-thrombomodulin-protein C system. *Thromb Haemost.* 2011;106(6):1076–83.
52. Eikelboom JW, Connolly SJ, Brueckmann M, Granger CB, Kappetein AP, Mack MJ, et al. Dabigatran versus Warfarin in Patients with Mechanical Heart Valves. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1206–14.
53. Dale B, Eikelboom J, Weitz J, Young E, Paikin J, Coppens M, et al. Dabigatran attenuates thrombin generation to a lesser extent than warfarin: could this explain their differential effects on intracranial hemorrhage and myocardial infarction? *J Thromb Thrombolysis.* 2013;35:295–301.
54. Foundation NK. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(suppl 1):S1–266.
55. Cut-off-values ADPtest and ASPItest. http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Multiplate_tests/ADPtest-ASPItest-Pocket.
56. Gurbel P a, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(19):1822–34.
57. Xavier H t., Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4, supl.1):1–20.

-
58. Larsen TB, Rasmussen L, Skjøth F, Due K, Callréus T, Rosenzweig M, et al. Efficacy and Safety of Dabigatran Etexilate and Warfarin in “ Real-World ” Patients With Atrial Fibrillation A Prospective Nationwide Cohort Study. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:2264–73.
 59. Graham DJ, Reichman ME, Wernecke M, Zhang R, Southworth MR, Levenson M, et al. Cardiovascular, bleeding, and mortality risks in elderly medicare patients treated with dabigatran or warfarin for nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;131(2):157–64.
 60. Olivier CB, Weik P, Meyer M, Weber S, Diehl P, Bode C, et al. Dabigatran and rivaroxaban do not affect AA- and ADP-induced platelet aggregation in patients receiving concomitant platelet inhibitors. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42(2):161–6.
 61. Franchi F, Rollini F, Rae Cho J, Bhatti M, DeGroat C, Tello-Montoliu A, et al. Effects of dabigatran on the cellular and protein phase of coagulation in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel Results from a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Thromb Haemost*. 2016;115:622–31.
 62. Martischnig AM, Mehilli J, Pollak J, Petzold T, Fiedler AK, Mayer K, et al. Impact of dabigatran versus phenprocoumon on ADP induced platelet aggregation in patients with atrial fibrillation with or without concomitant clopidogrel therapy (the Dabi-ADP-1 and Dabi-ADP-2 Trials). *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–10.
 63. Cannon CP, Bhatt DL, Oldgren J, Lip GYH, Ellis SG, Kimura T, et al. Dual Antithrombotic Therapy with Dabigatran after PCI in Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 27;377(16):1513–24.

64. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest*. 2001;119(1):64S–94S.
65. Spencer F, Ball S, Zhang Q, Liu L, Benoit S, Becker R. Enoxaparin, a low molecular weight heparin, inhibits platelet-dependent prothrombinase assembly and activity by factor-Xa neutralization. *J Thromb Thrombolysis*. 2000;9(3):223–8.
66. Aggarwal A, Whitaker D, Rimmer J, Solomon R, Gennari J, Sobel B, et al. Attenuation of platelet reactivity by enoxaparin compared with unfractionated heparin in patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transpl*. 2004;19(6):1559–63.
67. Aggarwal A, Sobel B, Schneider D. Decreased platelet reactivity in blood anticoagulated with bivalirudin or enoxaparin compared with unfractionated heparin: implications for coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis*. 2002;13:161–65.
68. Olivier CB, Weik P, Meyer M, Weber S, Anto-Michel N, Diehl P, et al. TRAP-induced platelet aggregation is enhanced in cardiovascular patients receiving dabigatran. *Thromb Res*. 2016;138:63–8.
69. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK, Meijers JC, Buller HR, Levi M. Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: A randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects. *Circulation*. 2011;124(14):1573–9.

70. Birri N, Baumgartner D, Conte T, Huynh A, Weller K, Reusserl M, et al. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. *Br J Haematol.* 2011;629–31.
71. Lindahl TL, Wallstedt M, Gustafsson KM, Persson E, Hillarp A. More efficient reversal of dabigatran inhibition of coagulation by activated prothrombin complex concentrate or recombinant factor VIIa than by four-factor prothrombin complex concentrate. *Thromb Res.* 2015;135(3):544–7.
72. Solbeck S, Meyer MAS, Johansson PI, Meyer ASP, Cotton BA, Stensballe J, et al. Monitoring of dabigatran anticoagulation and its reversal in vitro by thrombelastography. *Int J Cardiol.* 2014;176(3):794–9.
73. Cotton BA, McCarthy JJ, Holcomb JB. Acutely Injured Patients on Dabigatran. *N Engl J Med.* 2011;365(21):2039–40.
74. Kozek-Langenecker S, Afshari A, Albaladejo P, Santullano C, De Robertis E, Filipescu D. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology. *Eur J Anaesthesiol.* 2013;30:270–382.
75. Thomas O, Larsson A, Tynngård N, Schött U. Thromboelastometry versus free-oscillation rheometry and enoxaparin versus tinzaparin: an in-vitro study comparing two viscoelastic haemostatic tests' dose-responses to two low molecular weight heparins at the time of withdrawing epidural catheters from t. *BMC Anesthesiol.* 2015;15(1):170.
76. Tsantes AE, Kyriakou E, Bonovas S, Chondrogianni M, Zompola C, Liantinioti C, et al. Impact of dabigatran on platelet function and fibrinolysis. *J Neurol Sci.* 2015;357(1–2):204–8.

77. Schneider DJ. Potential Contribution of Pleiotropic Effects of Direct Anticoagulants to Clinical Benefits. *Drug Dev Res.* 2013;74(7):472–7.
78. Wang L, Luo J, He S. Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release. *BMC Cell Biol.* 2007;8:14.
79. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1416–25.
80. Gómez-Outes A, Lagunar-Ruiz J, Terleira-Fernández A-I, Calvo-Rojas G, Suárez-Gea ML, Vargas-Castrillón E. Causes of Death in Anticoagulated Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(23):2508–21.
81. Dugan G, O'Donnell L, Hanbury DB, Cline JM, Caudell DL. Assessment of Multiplate® platelet aggregometry using Citrate, Heparin or Hirudin in Rhesus macaques. *Platelets.* 2015;26(8):730–5.
82. Kalb ML, Potura L, Scharbert G, Kozek-Langenecker SA. The effect of ex vivo anticoagulants on whole blood platelet aggregation. *Platelets.* 2009;20(1):7–11.
83. Solomon C, Ranucci M, Hochleitner G, Schochl H, Schlimp CJ. Assessing the methodology for calculating platelet contribution to clot strength (platelet component) in thromboelastometry and thrombelastography. *Anesth Analg.* 2015;121(4):868–78.
84. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* 2011;127:S21–5.