



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

“Determinación de los factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados a la variabilidad del INR y su relación con las concentraciones plasmáticas de un medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en pacientes anticoagulados”

TESIS

Para obtener el título de
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

PRESENTA

Q.F.B. Rodríguez Pérez Omar

San Luis Potosí, S.L.P., México, Agosto 2022.

El programa de **Maestría en Ciencias en Farmacobiológicas** de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 003383 en el nivel “En Desarrollo”.

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Beca-Tesis del CONACYT: Número de registro: 781982

No. CVU: 190542



Determinación de los factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados a la variabilidad del INR y su relación con las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en pacientes anticoagulados por Rodríguez Pérez Omar se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reporta un 14% de similitud

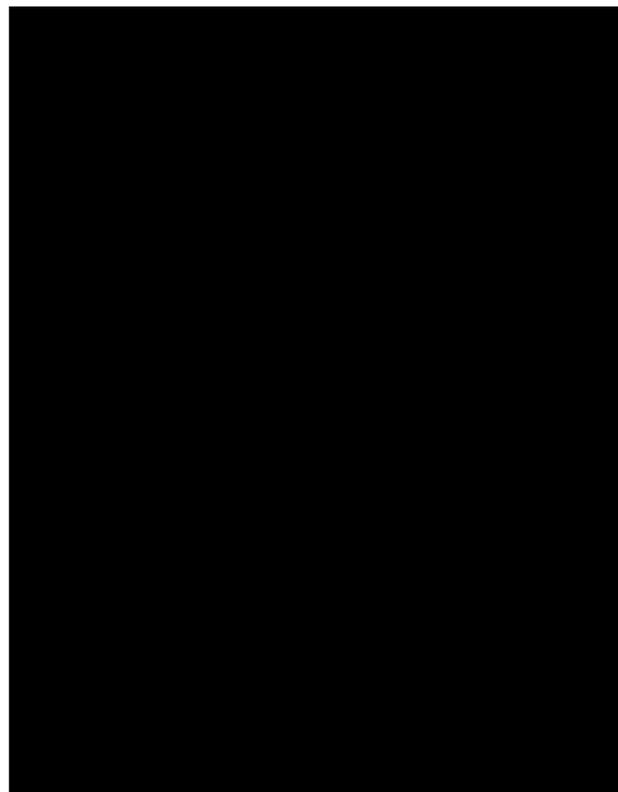
| |
|---------------------------------------|
| Rodríguez Pérez Omar-Tesis 220822.pdf |
| INFORME DE ORIGINALIDAD |
| 14% |
| ÍNDICE DE SIMILITUD |

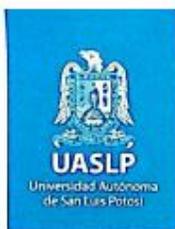
INTEGRANTES DEL JURADO:

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP
Presidente

Dra. Silvia Romano Moreno
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP
Secretario

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP
Vocal





POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS
Tel: 826-23-00 ext. 6541 y 6540

San Luis Potosí, S.L.P., a 19 de agosto de 2022



**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Maestría QFB. **Omar Rodríguez Pérez**, titulada **“Determinación de los factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados a la variabilidad del INR y su relación con las concentraciones plasmáticas de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes anticoagulados”**, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el día **26 de agosto del 2022** a las **17:00 hrs.** en el **Sala de Exámenes Presionales 1 y 2**, de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay
Director de Tesis

Dra. Úrsula Fabiola Medina Moreno
Co-Directora de Tesis

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
Asesor interno PCFB

Dra. Antonio Augusto Gordillo Moscoso
Asesor interno PCFB



www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria - CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372

SUBCOMITÉ DE TESIS

Directora de Tesis

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay

Profesor Investigador Tiempo Completo

Facultad de Ciencias Químicas, UASLP

Co-Directora de Tesis

Dra. Úrsula Fabiola Medina Moreno

Profesor Investigador Tiempo Completo

Facultad de Medicina, UASLP

Asesora Interna PCFB

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia

Profesor Investigador Tiempo Completo

Facultad de Ciencias Químicas, UASLP

Asesor Interno PCFB

Dr. Antonio Augusto Gordillo Moscoso

Profesor Investigador Tiempo Completo

Facultad de Medicina, UASLP

Asesor Clínico

Dr. Juan Manuel López Quijano

Jefe Subdirección de Enseñanza e Investigación en Salud

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

DEDICATORIA

A mi madre, por su apoyo incondicional durante mi proceso de formación profesional.

A mis hermanos, Alberto, Emiliano y Mariana por su apoyo, sus consejos y peleas durante mis episodios de estrés.

A panchito y la gorda por acompañarme en mis noches de desvelo.

A Minerva, por siempre motivarme a ser la mejor versión de mi (You´re my person).

A mis asesores, por ayudarme a incursionar en el campo de la investigación.

“El primer paso para entender tu poder es conocer su alcance”.

Profesor Charles Xavier

AGRADECIMIENTOS

A **la Dra. Susy** por la confianza que me brindo al aceptar dirigir mi tesis. Agradezco el apoyo, los consejos y regaños que me permitieron incursionar en el mundo de la farmacometría.

A mi asesores, **la Dra. Úrsula, el Dr. Gordillo (Jefe), la Dra. Rosy y el Dr. Quijano**, por sus consejos, asesoramiento en el área de la farmacología y la cardiología que me permitieron enriquecer mi formación profesional.

Al **Dr. Jair Pulido, Cesar Martínez y Juan Silva**, por su brindarme la confianza de reclutar a sus pacientes y permitirme acompañarlos durante sus consultas reafirmando mi gran pasión por la cardiología.

A la maestra **Christian Jazmín**, por su apoyo y asesoría durante las crisis en el laboratorio y hacer más amena mi estancia.

A **Ivette, Rodrigo, Paco y Vane**, amigos y compañeros de generación que hicieron más llevadera mi estancia durante la maestría.

A **Coco y Frida** (veteranas de guerra) por su cálida bienvenida al equipo de investigación en el laboratorio de biofarmacia. Agradezco los consejos y el asesoramientos brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A los de siempre (**Mariana, Vero, Canela, Chelito y Tere**), por su gran amistad y compañía en los buenos y malos momentos.

A la **“Tía Rena”** por siempre consentirme y brindarme su amor y cariño.

A cada uno de los pacientitos que acepto a participar en el estudio y depositó su confianza en mí.

RESUMEN

El índice internacional normalizado (INR), biomarcador empleado en la monitorización de medicamentos anticoagulantes, está modificado por diferentes factores que dificultan el ajuste de dosis. En el presente estudio se evaluó el grado de asociación entre dichos factores y el INR por medio de un modelo de regresión lineal multivariada empleando los datos obtenidos de los pacientes incluidos en el estudio (64% mujeres), con rango de edad entre 33 a 72 años con diagnóstico de remplazo valvular (mitral y aórtico) y fibrilación auricular que se encontraban en tratamiento con el medicamento anticoagulante. El modelo de mejor ajuste logró explicar hasta el 70% de la variabilidad del INR (R^2 ajustada = 0.757 ($p < 0.001$)) e incluyó como covariables a la edad, las comorbilidades y las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito.

PALABRAS CLAVE: Medicamento anticoagulante, Índice Normalizado Internacional (INR), HPLC/UV-Vis, polimorfismo genético, VKORC1, vitamina K, interacciones farmacológicas.

ABSTRACT

The international normalized ratio (INR), a biomarker used in anticoagulant drug monitoring, is modified by different factors making dose adjustment difficult. In the present study, the degree of association between these factors and the INR was evaluated by means of a multivariate linear regression model using the data obtained from all the patients included in the study (64% women), with an age range between 33 and 72 years with a diagnosis of valve replacement (mitral and aortic) and atrial fibrillation who were being treated with the anticoagulant drug. The best-fit model was able to explain up to 70% of the INR variability (adjusted $R^2 = 0.757$ ($p < 0.001$)) and included age, comorbidities, and plasma concentrations of the anticoagulant drug and its metabolite as covariates.

KEY WORDS: Anticoagulant drug, International Normalized Ratio (INR), HPLC/UV-Vis, genetic polymorphism, VKORC1, vitamin K, drug interactions.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 2 |
| 2.1 Fibrilación auricular | 2 |
| 2.2 Enfermedades valvulares | 3 |
| 2.3 Manejo clínico y terapéutico de las FA y las EV | 3 |
| 2.4 Terapia anticoagulante | 5 |
| 2.5 El medicamento anticoagulante | 5 |
| 2.5.1 Farmacocinética del medicamento anticoagulante | 7 |
| 2.5.2 Variabilidad de la respuesta a el medicamento anticoagulante | 7 |
| 2.6 Monitorización de la terapia anticoagulante | 10 |
| 2.6.1 Índice internacional normalizado (INR) | 12 |
| 2.6.2 Monitorización terapéutica del medicamento anticoagulante | 13 |
| 2.7 Métodos analíticos para la cuantificación del medicamento anticoagulante | 13 |
| 2.8 Interacciones farmacológicas | 14 |
| 2.9 Efecto de la dieta sobre la respuesta farmacológica | 17 |
| 2.10 Farmacogenética del medicamento anticoagulante | 18 |
| 3. Justificación | 19 |
| 4. Hipótesis | 20 |
| 5. Objetivos | 20 |
| 5.1 Objetivo general | 20 |
| 5.2 Objetivos específicos | 20 |

| | |
|--|----|
| 6. Metodología | 21 |
| 6.1 Metodología de investigación farmacológica | 21 |
| 6.1.1 Equipo y Reactivos | 21 |
| 6.1.2 Estandarización del método analítico para la cuantificación del medicamento anticoagulante y metabolito hidroxilado en muestras de plasma sanguíneo | 22 |
| 6.1.2.1 Condiciones Cromatográficas | 22 |
| 6.1.2.2 Estabilización del equipo | 23 |
| 6.1.2.3 Preparación curva de calibración y controles de calidad | 23 |
| 6.1.2.4 Método de extracción en muestras de plasma. | 24 |
| 6.1.3 Validación del método analítico en plasma | 24 |
| 6.1.3.1 Linealidad | 24 |
| 6.1.3.2 Precisión | 25 |
| 6.1.3.3 Exactitud | 25 |
| 6.1.3.4 Selectividad | 26 |
| 6.3.6 Estabilidad de la muestra | 27 |
| 6.1.4 Genotipificación PCR tiempo real acoplado a sonda TaqMan™ | 27 |
| 6.1.4.1 Extracción ADN genómico | 28 |
| 6.1.4.2 Reacción de amplificación | 28 |
| 6.1.4.3 Condiciones termociclador | 28 |
| 6.2 Metodología investigación clínica | 28 |
| 6.2.1 Diseño del estudio | 28 |
| 6.2.2 Lugar de realización | 29 |
| 6.2.3 Universo de estudio | 29 |
| 6.2.4 Método de muestreo | 29 |

| | |
|--|----|
| 6.2.5 Tamaño de muestra | 29 |
| 6.2.6 Criterios de selección..... | 29 |
| 6.2.7 Plan de trabajo | 30 |
| 6.2.8 Análisis de muestras sanguíneas..... | 31 |
| 6.2.9 Evaluación ingesta dietética de vitamina K | 31 |
| 6.2.10 Detección de interacciones medicamentosas | 32 |
| 6.2.11 Cuadro de variables..... | 33 |
| 6.2.12 Análisis estadístico | 35 |
| 6.2.13 Aspectos éticos | 36 |
| 7. Resultados..... | 37 |
| 7.1 Estandarización del método analítico de cuantificación | 37 |
| 7.1.1 Condiciones cromatográficas..... | 37 |
| 7.1.2 Cromatograma en agua..... | 37 |
| 7.1.4 Cromatograma en plasma..... | 37 |
| 7.2 Validación de la técnica de bioanálisis | 38 |
| 7.2.1 Linealidad en matriz biológica de plasma..... | 38 |
| 7.2.2 Precisión y exactitud | 38 |
| 7.2.4 Selectividad..... | 38 |
| 7.2.5 Estabilidad de la muestra..... | 39 |
| 7.3 Estudio clínico | 40 |
| 7.3.1 Características demográficas y clínicas de la población | 40 |
| 7.3.2 Concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y metabolito hidroxilado. | 40 |
| 7.3.3 Genotipificación del polimorfismo VKORC1 | 41 |

| | |
|---|----|
| 7.3.4 Detección de interacciones medicamentosas | 42 |
| 7.3.5 Determinación del consumo de vitamina K | 43 |
| 7.3.7 Análisis de regresión multivariada | 44 |
| 8. Discusión de resultados | 46 |
| 9. Conclusiones | 61 |
| 10. Referencias bibliográficas | 62 |
| 11. Glosario | 69 |

1. Introducción

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte en la población mexicana, representado el 20% de los decesos anuales (1). La terapia anticoagulante se ha mantenido como una de las principales alternativas farmacológicas en el manejo profiláctico de esta patología. Se ha mejorado el pronóstico de los pacientes, en el cual el medicamento anticoagulante se ubica como uno de los principales medicamentos que cumplen esta función (2). La optimización de la terapia farmacológica con el medicamento anticoagulante involucra un gran reto clínico debido a la gran diversidad de factores que modifican la respuesta al fármaco generando una gran variabilidad interindividual.

Los pacientes anticoagulados son monitorizados de manera rutinaria empleando el tiempo de protrombina (TP), expresado de manera estandarizada como índice internacional normalizado (INR por sus siglas en inglés) (3), para el cual se establece un intervalo entre 2 a 3.5 para pacientes con un buen control de la anticoagulación. Dicho intervalo puede modificarse basado en las características clínicas individuales de cada paciente. La presencia de factores como la edad, la dieta, las interacciones farmacológicas, las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado no se consideran de manera habitual e integral en la práctica clínica; como consecuencia algunos individuos no responden adecuadamente al tratamiento y se observan valores poco constantes del INR en este tipo de pacientes (4,5).

El periodo de tiempo que transcurre mientras se efectúa un adecuado ajuste de dosis en el paciente, es prolongado, por lo que el paciente se encuentra fuera de rango terapéutico y el riesgo de sufrir un evento trombótico o hemorrágico está latente. Dicho lo anterior surge la necesidad de evaluar de manera integral la influencia que dichos factores poseen sobre los valores del INR, permitiendo diseñar una estrategia que permita ubicar y mantener al paciente dentro del rango terapéutico.

2. Antecedentes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2019 reportó que las enfermedades cardiovasculares que encabezan la lista de mortalidad a nivel mundial son las cardiopatías isquémicas y los accidentes cerebrovasculares; sin embargo, estos eventos son considerados complicaciones secundarias a otros trastornos cardiovasculares entre los que se ubica la fibrilación auricular (FA) y las enfermedades valvulares (EV) debido a su gran tasa trombogénica (6).

2.1 Fibrilación auricular.

La FA es la arritmia cardíaca más frecuente en el mundo, afecta a más de 33 millones de personas a nivel mundial, y su prevalencia en mayores de 40 años es del 1%, tasa que se ve incrementada en edades más avanzadas llegando hasta un 15% para los mayores de 80 años (7) donde la hipertensión arterial sistémica (HAS) y la obesidad son los principales factores que predisponen a la aparición de la enfermedad (8).

La FA se caracteriza por una frecuencia cardíaca acelerada e irregular que impide la correcta sincronización entre los compartimentos del corazón. El agente desencadenante de la fibrilación auricular se atribuye a anomalías estructurales y electrofisiológicas que alteran el tejido auricular y promueven la formación y propagación de un impulso anormal que se manifiesta en el incremento súbito de la frecuencia cardíaca y cuyo sostenimiento se debe a la propagación del impulso cardíaco por un mecanismo de reentrada que impide su cese.

El curso crónico de la enfermedad involucra dos principales complicaciones; la formación de coágulos sanguíneos dentro de las cavidades cardíacas, el desarrollo de insuficiencia cardíaca y afección a la funcionalidad de las válvulas, siendo estas las principales causas a las que se le atribuye su alta morbi-mortalidad (9).

2.2 Enfermedades valvulares.

Las EV o también denominadas valvulopatías se caracterizan por una disfunción de las válvulas cardíacas (tricúspide, mitral, pulmonar y aórtica) que impiden el correcto tránsito de la sangre a través de las diferentes cavidades del corazón. Su prevalencia es del 1.8% en adultos, tasa que se ve incrementada hasta un 11% en los mayores de 75 años, de la cuales la estenosis aórtica y la insuficiencia mitral son las más frecuentes (10,11).

Las EV se manifiestan a través de dos principales complicaciones, la “estenosis” (estrechamiento del orificio valvular), que impide el paso de la sangre de una cavidad a otra y la “insuficiencia valvular” (incapacidad de cierre) que promueve el retorno de la sangre a su cámara de procedencia. Su etiología es multifactorial y su desarrollo se encuentra principalmente asociado a procesos inflamatorios e infecciosos (fiebre reumática/endocarditis), procesos isquémicos (síndrome coronario) y malformaciones congénitas (11).

Durante estos eventos, las válvulas pueden sufrir modificaciones estructurales que promueven su engrosamiento, rigidez, rotura, o calcificación lo que origina la disminución del orificio valvular o la incapacidad para promover su cierre completo al final de la contracción. Es importante resaltar, que cuando la disfunción valvular se origina a nivel tricúspide o mitral se induce una pérdida de la funcionalidad de las aurículas provocando la aparición de trastornos en el ritmo cardíaco cuya evolución se manifiesta en la aparición de fibrilación auricular valvular, siendo esta una causa secundaria para el desarrollo de esta patología (12).

2.3 Manejo clínico y terapéutico de las FA y las EV.

El manejo clínico de la FA y EV puede abordarse desde diferentes alternativas basadas en la fisiopatología de la enfermedad. En el caso de la FA como primera estrategia se encuentra recuperar y mantener el ritmo sinusal del corazón mediante cardioversión eléctrica (7). Si esto no se logra, se acepta el trastorno del ritmo y se opta por el manejo

farmacológico, situación que ocurre en la mayoría de los casos. El objetivo de la terapia farmacológica es actuar sobre la frecuencia ventricular, induciendo su disminución con el empleo de fármacos beta bloqueadores y calcio antagonistas. Además, se puede recuperar el ritmo cardiaco con el empleo de antiarrítmicos y digitálicos.

Con respecto de la EV, hasta el momento no existe un tratamiento farmacológico que permita revertir el daño valvular. El manejo terapéutico de la enfermedad está enfocado en ralentizar la progresión y complicación de la enfermedad, así como controlar los síntomas derivados. Como primer punto, se encuentra el control de la presión arterial, haciendo uso de fármacos antihipertensivos (Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y beta bloqueadores) en concomitancia con diuréticos en caso de que el paciente desarrolle edema. Otra alternativa viable para el manejo de las valvulopatías es el tratamiento quirúrgico, a través del cual se opta por reemplazar las válvulas afectadas por prótesis biológicas o mecánicas que permitan mejorar y preservar la función cardíaca (10).

En ambos padecimientos una de las principales complicaciones que se suscitan es el desarrollo y producción de coágulos sanguíneos. El origen trombótico en este tipo de enfermedades se explica por las modificaciones que sufre el flujo de la sangre a través de las diferentes cavidades del corazón. En la FA y las EV, la cantidad de sangre que fluye de compartimento a compartimento se ve reducida, el flujo se torna turbulento y mucho más lento (principalmente en las aurículas), lo que causa un incremento en la “estasis sanguínea”. Este fenómeno es responsable del origen y formación de coágulos dentro de las cavidades cardíacas. Dichos coágulos poseen la capacidad de viajar e inducir procesos trombóticos a diferentes niveles del organismo, siendo el evento cerebro vascular (EVC), la complicación más importante de esta enfermedad. El riesgo relativo (RR) reportado es de 2 a 7 veces mayor, que el de los pacientes sin este tipo de patologías cardíacas (13). Por ello el abordaje terapéutico debe ir estrictamente acompañado de fármacos que permitan reducir eventos trombóticos en este tipo de pacientes.

2.4 Terapia anticoagulante.

La terapia anticoagulante es una de las principales alternativas terapéuticas de uso actual para el manejo de la fibrilación auricular y enfermedades valvulares. Su utilidad clínica es prevenir la formación de coágulos que induzcan un evento cerebrovascular o un evento trombótico. Existen una gran diversidad de medicamentos anticoagulantes y se clasifican en dos categorías principales: los antagonistas de la vitamina K (AVK), entre los que figuran la warfarina y acenocumarol, y los inhibidores directos del factor X, como dabigatrán y rivaroxabán. Estos últimos son de uso relativamente nuevo, con un costo mayor en el mercado y un índice de seguridad menor que los AVK (14) los cuales son ampliamente prescritos en el territorio mexicano debido a su bajo costo y gran accesibilidad para la terapia ambulatoria.

2.5 El medicamento anticoagulante.

Los AVK son medicamentos derivados de compuestos cumarínicos. Dentro de este grupo, se ubica principalmente a el medicamento anticoagulante, cuyo mecanismo de acción es inhibir a la epóxido reductasa (VKORC1), a través de un antagonismo competitivo debido a la gran analogía estructural que presentan (Figura 1).

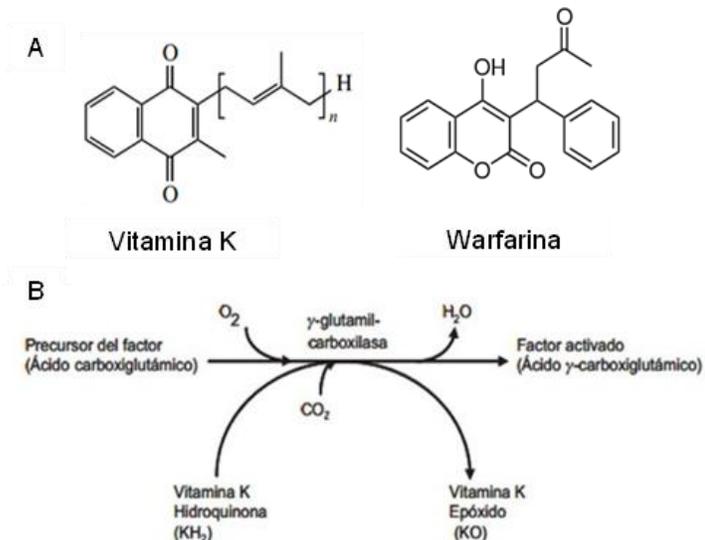


Figura 1. Mecanismo de acción de los AVK

(A) Analogía estructural "El medicamento anticoagulante vs Vitamina K", (B) Ciclo de la vitamina K, regulación de la γ -glutamil-carboxilasa.

La VKORC1 es la encargada de regenerar a la vitamina K, la cual participa regulando la actividad de la enzima carboxilasa, que a su vez es responsable de activar a los factores de coagulación II, VII, IX y X (Figura 2). La reducción en la actividad de esta enzima promueve la disminución de factores carboxilados de un 30 a 40%. Lo anterior, se ve reflejado en un incremento del tiempo de protrombina (PT), disminuyendo a su vez, la actividad extrínseca de coagulación en la sangre (15).

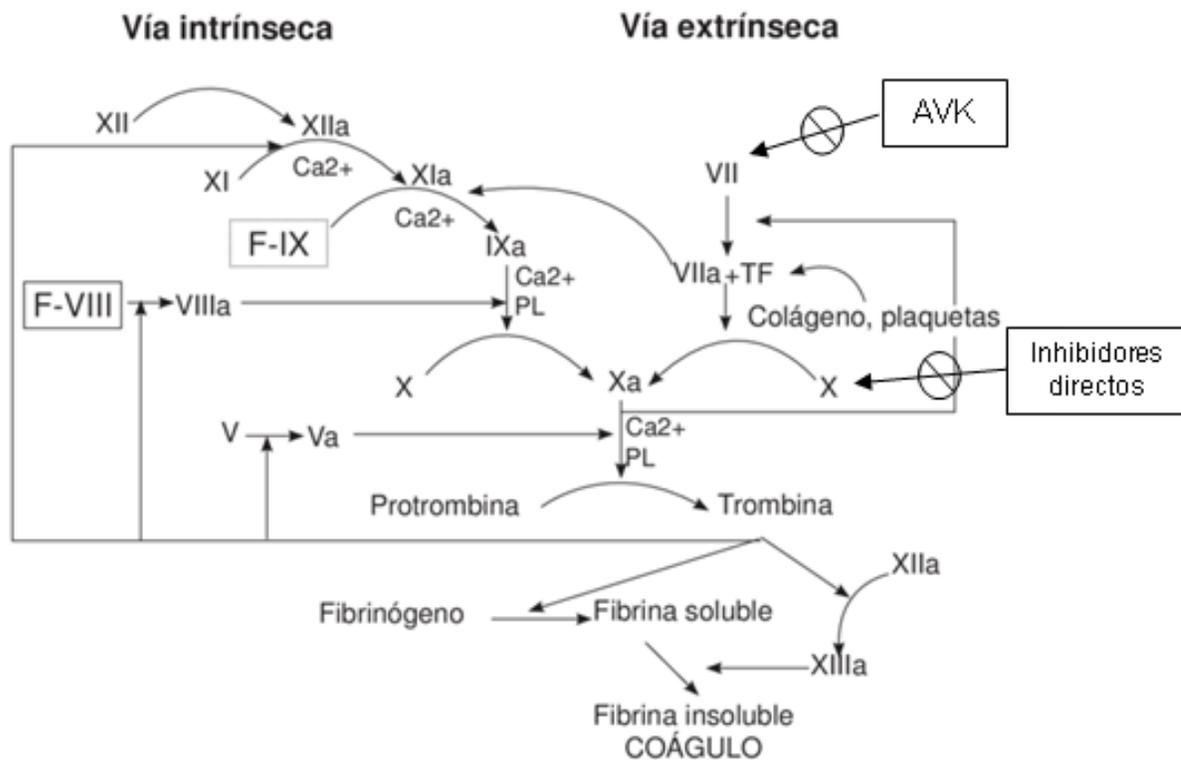


Figura 2. Los AVK y los inhibidores directos

Efecto de los AVK y los inhibidores directos sobre la cascada de coagulación

2.5.1 Farmacocinética del medicamento anticoagulante.

El medicamento anticoagulante es un fármaco con vida media de eliminación larga (36 a 42 h), volumen de distribución pequeño (0.14 L/Kg), alta unión a proteínas plasmáticas (<97%) y biodisponibilidad del 95% (16,17). El medicamento anticoagulante posee un metabolismo mayoritariamente hepático por el citocromo p450, siendo la isoenzima CYP2C9, la principal responsable de sus reacciones de hidroxilación (15), lo que produce metabolitos que son mayoritariamente eliminados por vía renal.

El medicamento anticoagulante está presente en forma de mezcla racémica, cada isómero R y S sufre su conversión a metabolitos hidroxilados en diferentes posiciones de la molécula. El metabolito que se produce en mayor proporción es aquel que se hidroxila en la posición 7 y provienen del isómero S, mientras que el isómero R produce un metabolito hidroxilado en la posición 3 y 4. Los metabolitos generados son mayoritariamente inactivos o poseen muy baja actividad anticoagulante y un incremento o decremento en su concentración se relaciona a modificaciones en el metabolismo hepático del medicamento anticoagulante (18).

2.5.2 Variabilidad de la respuesta a el medicamento anticoagulante.

El medicamento anticoagulante se caracteriza por presentar una ventana terapéutica muy estrecha respecto a los valores del INR. Valores inferiores a 2, suscitarían la aparición de un evento trombótico y valores superiores a 3.5, un evento hemorrágico (19). Además, la respuesta farmacológica se encuentra modificada por una gran diversidad de factores tales como edad, composición corporal, dieta, interacciones farmacológicas, comorbilidades, factores ambientales y genéticos. Este último, debido a la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que se asocian principalmente a la isoenzima responsable de su metabolismo, el CYP2C9 y a la epóxido reductasa de la vitamina K (VKORC1) (20). En la tabla 1, se analizan todos los factores involucrados en la respuesta a el medicamento anticoagulante y el nivel al que impactan.

Tabla 1. Factores involucrados en la variabilidad de la respuesta a el medicamento anticoagulante

| Factores | Efecto en la respuesta a el medicamento anticoagulante |
|-------------------------------------|---|
| Edad y comorbilidades | La FA se manifiesta de manera prevalente en adultos mayores. La mayoría de los casos se suscitan en edades superiores a los 60 años (9). Los adultos mayores cursan con un deterioro fisiológico normal de las funciones hepáticas y renales. Dichos procesos están involucrados en el metabolismo y eliminación de fármacos. El medicamento anticoagulante es mayoritariamente metabolizado por el hígado, por lo cual, deficiencias a nivel hepático podrían provocar un incremento en el tiempo de vida media del fármaco. Adicionalmente las edades avanzadas se relacionan con un incremento en la aparición de diferentes comorbilidades que promueven la polifarmacia en el paciente favoreciendo la aparición de interacciones farmacológicas (21). |
| Composición corporal | La mayoría de los fármacos se dosifican principalmente tomando en cuenta el peso corporal del paciente, sin embargo, el medicamento anticoagulante es un fármaco altamente unido a proteínas plasmáticas por lo que su distribución se efectúa mayoritariamente a nivel vascular cuya presencia en tejidos principalmente el adiposo es prácticamente nula (16). Modelos PK/PD han evidenciado que considerar el peso corporal no es de utilidad para la optimización de la terapia con el medicamento anticoagulante, sin embargo, el cálculo de la masa libre de grasa se reportó como el mejor predictor para observar la influencia de la composición corporal sobre el aclaramiento y el volumen de distribución (22). |
| Dieta | Un incremento en el consumo de alimentos ricos en vitamina K disminuyen el efecto anticoagulante del medicamento anticoagulante. El consumo de este tipo de alimentos incrementa las concentraciones séricas de vitamina K compitiendo con el medicamento anticoagulante impidiendo su actividad farmacológica (23,24). Por otro lado, una dieta baja en el consumo de proteínas puede suscitar un decremento en las concentraciones plasmáticas de albumina incrementando la fracción libre del medicamento anticoagulante, la cual es responsable del efecto terapéutico. Al incrementarse la fracción libre se incrementa el riesgo de sufrir un evento hemorrágico a causa de una sobredosificación (25). |
| Interacciones farmacológicas | Las interacciones farmacológicas causadas por un estado de polifarmacia en el paciente pueden modificar la respuesta a el medicamento anticoagulante. A nivel farmacocinético se ubican aquellos medicamentos que inducen o inhiben el metabolismo del medicamento anticoagulante (fluconazol, amiodarona, carbamazepina), y aquellos que pueden desplazar a el medicamento anticoagulante de sus sitios de unión a albumina (ácido acetilsalicílico) mientras que a nivel farmacodinámico aquellos fármacos que inhiben la síntesis de vitamina K (antibióticos) y los que actúan a nivel de los factores de coagulación induciendo metabolismo (levotiroxina) o hemoconcentración (clortalidona y espironolactona) (26). |

| | |
|--|--|
| <p>Polimorfismo CYP2C9</p> | <p>Se han identificado 2 variantes alélicas que contribuyen a la modificación de la actividad metabólica de la isoenzima CYP2C9. La variante *2 y *3 cuya prevalencia en población mexicana es del 1 y 6%, respectivamente. Los genotipos *1/*2 y *1/*3 se asocian a un metabolismo intermedio y los genotipos *2/*2, *2/*3 y *3/*3 a un metabolismo lento. En ambos casos existe un incremento de la vida media del fármaco al verse reducida la tasa metabólica que se refleja en un incremento de la actividad anticoagulante si el esquema posológico no se modifica, sin embargo, su prevalencia en población mexicana para el fenotipo de metabolizador lento es de apenas el 1% (27).</p> |
| <p>Polimorfismo VKORC1</p> | <p>El gen codificante para la enzima VKORC1, posee diferentes polimorfismos (SNP) que se encuentran en cercanía del gen promotor en la región intrónica, lo que puede modificar la cantidad de ARNm que se expresa y por ende la cantidad de enzima que se produce. Se han identificado dos principales regiones asociadas a una disminución en la expresión de ARNm. La posición 1639 (G→A) y la posición 1173 (C→T), en ambos casos la VKORC1 estará disminuida y el resto se encontrará inhibida por el medicamento anticoagulante, incrementando así el efecto anticoagulante si el régimen posológico no se modifica. En población mexicana se ha reportado una frecuencia para la posición 1639 del 47% para GA y del 20% para AA (27)</p> |
| <p>Factores ambientales</p> | <p>En el caso del alcohol, su consumo de forma aguda y en grandes cantidades se asocia a una inhibición del metabolismo hepático (28) y al desplazamiento del medicamento anticoagulante de su sitio de unión a albumina (29,30), lo que podría implicar un incremento de la actividad anticoagulante. De manera crónica, el consumo de alcohol podría estar relacionado al desarrollo de cirrosis e insuficiencia hepática conduciendo a una disminución en la producción de los factores de coagulación y de albumina sérica donde la absorción de la vitamina K (liposoluble) también se ve disminuida por el decremento en la producción de sales biliares (31). En el caso del tabaquismo, su consumo crónico se ha relacionado con un efecto de inductor enzimático, incrementando el aclaramiento del medicamento anticoagulante y por lo tanto un aumento en el requerimiento de dosis (32).</p> |

Por lo anterior, uno de los principales retos que se enfrentan durante la práctica clínica, es el establecimiento de una dosis adecuada e individualizada para cada paciente. Durante el inicio del tratamiento con el medicamento anticoagulante las guías de práctica clínica, indican iniciar con una dosis estandarizada del medicamento anticoagulante (usualmente de 5 mg/día) (33) De manera rutinaria, no se consideran factores individuales de los pacientes lo que suele provocar la aparición de reacciones adversas en las primeras semanas del tratamiento.

Se han reportado casos de pacientes que alcanzan valores de INR superiores a 3, en pocos días y de manera contraria, pacientes que tras un largo periodo de tiempo no logran alcanzar el intervalo terapéutico, aun cuando la dosis se modifica (34). Durante este periodo de tiempo, el paciente se encuentra fuera de rango terapéutico y el riesgo de sufrir un evento trombótico o hemorrágico está latente, razón por la cual surge la necesidad de realizar una evaluación más exhaustiva de cada paciente en busca de factores que orienten a un mejor abordaje clínico.

2.6 Monitorización de la terapia anticoagulante.

Los pacientes bajo tratamiento anticoagulante requieren de un seguimiento estricto que vigile la hemostasia y capacidad de coagulación de la sangre. De manera usual, las pruebas clínicas que las evalúan se fundamentan en una reacción in vitro que mide el tiempo que tarda en formarse un coágulo a partir de una muestra sanguínea.

De manera rutinaria, se han reportado 5 principales parámetros para evaluar la capacidad de coagulación de la sangre (35): el tiempo de sangrado, el tiempo de trombina (TT), el tiempo de protrombina (TP), el tiempo parcial de tromboplastina activado (TPT) y el INR, los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de coagulación

| Prueba | Descripción | Usos y aplicaciones |
|---|---|---|
| Tiempo de sangrado | Se determina el tiempo que tarda en interrumpirse el sangrado tras una punción pequeña en la superficie de la piel. | Evalúa de manera generalizada la capacidad del paciente para regular el sangrado tras una ruptura de vasos sanguíneos. Se emplea principalmente para evaluar la función plaquetaria y el seguimiento a patologías asociadas a su disminución. |
| Tiempo de trombina (TT) | Tiempo que tarda la conversión de fibrinógeno a fibrina por la actividad de la trombina para formar un coágulo. | Evalúa la vía común de la coagulación en su última etapa. Su uso es requerido cuando los niveles o la funcionalidad del fibrinógeno son anormales. |
| Tiempo de protrombina (TP) | Tiempo que tarda en formarse el coágulo cuando se induce la coagulación en presencia del factor tisular o tromboplastina y calcio. | Evalúa la vía extrínseca de la coagulación. Sirve para evaluar el estado de coagulación en hepatopatías, deficiencia de vitamina K, y en presencia de fármacos AVK. |
| Tiempo parcial de tromboplastina activado (TPT) | Tiempo requerido para la aparición de fibrina tras mezclar plasma con sustitutos de los fosfolípidos plaquetarios. | Se utiliza para evaluar alteraciones a nivel de la vía intrínseca y común de la coagulación (deficiencia de factores XII, XI, IX y VIII); es de utilidad para monitorizar el tratamiento con heparina sódica y para evaluar la presencia de anticoagulante lúpico y otras enfermedades autoinmunes. |
| Índice normalizado internacional (INR) | Forma estandarizada de reportar TP. Resulta de dividir el TP del paciente con respecto a un TP de una persona sana y se eleva al valor del ISI (índice de sensibilidad internacional de la tromboplastina) que se obtiene del material de referencia que se empleó para calibrar el equipo en el cual se efectuó la medición. | Evalúa la vía extrínseca de la coagulación (deficiencia de factor VII principalmente), deriva del TP como un parámetro estandarizado que disminuye la variabilidad durante el proceso de medición entre laboratorios al emplear diferentes equipos, materiales de calibración y reactivos. Este parámetro es ampliamente usado para la monitorización de la terapia anticoagulante con AVK. |

Si bien el TP evalúa la vía extrínseca de la coagulación, su determinación presenta una gran variabilidad entre laboratorios debido al uso de diferentes equipos, reactivos y calibradores. Por lo anterior, el INR se establece como el parámetro que mejor predice el estado de coagulación del paciente, al disminuir esta variabilidad. Ambos evalúan la vía extrínseca en donde participan principalmente los factores dependientes de vitamina K, por lo cual el tratamiento con AVK debe ser monitorizado estrictamente bajo este parámetro (14).

2.6.1 Índice internacional normalizado (INR).

En la práctica clínica actual, el INR es considerado el estándar de oro en la optimización de este tipo de terapia. Las guías de práctica clínica vigentes establecen como rango terapéutico los valores de 2 a 3 (36), en el cual valores inferiores a 2 (infra-dosificación) suponen un riesgo para evento trombótico y valores superiores a 3 (sobredosificación) aumentan el riesgo de un evento hemorrágico. Por esta razón, el medicamento anticoagulante es considerada un fármaco de estrecho margen terapéutico (15) que requiere de un seguimiento muy estricto y gran cooperación por parte del paciente.

El INR surge como un parámetro necesario para estandarizar la medición del TP disminuyendo la variabilidad de la determinación entre laboratorios. Blasdale y cols. y Rahmatini y cols., sugieren que el INR no es el predictor más completo para evaluar el grado de anticoagulación en el paciente (37,38). Esto, debido a que se encuentra modificado por una gran cantidad de factores que influyen en el TP y generan interferencia con el medicamento anticoagulante a nivel farmacodinámico ya sea potenciando la respuesta anticoagulante o disminuyéndola. Los principales factores involucrados en la variabilidad del INR y que han sido previamente reportados son el consumo de vitamina K, las interacciones farmacológicas, las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y el polimorfismo VKCOR1 1639 (G→A) cuya prevalencia en población mexicana es del 47% (GA) y 19% (AA) (27). Dichos

factores tienen influencia a nivel del mecanismo de acción y poseen la capacidad de modificar los valores del INR.

2.6.2 Monitorización terapéutica del medicamento anticoagulante.

Uno de los principales inconvenientes que se han reportado con respecto a la monitorización del medicamento anticoagulante, es la baja correlación que existe entre las concentraciones plasmáticas y el INR (38–40). Por lo anterior, es complicado para los profesionales del área de la salud, determinar el valor de INR únicamente ajustando la dosis, ya que se deben considerar los factores previamente descritos (factores clínicos, ambientales y genéticos).

La determinación de las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante podría ser útil para evaluar el grado de cumplimiento por parte del paciente o incluso evidenciar cambios en la absorción causados por la disminución de la motilidad intestinal, aumento del pH gástrico, disminución del flujo esplénico y disminución del transporte activo intestinal debido al deterioro fisiológico normal del adulto mayor. Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de metabolitos hidroxilados en sangre podrían evidenciar de manera más directa la capacidad metabólica de cada individuo sobre el medicamento anticoagulante y poder vigilar de manera más estrecha el efecto de las interacciones inductoras o inhibitoras del metabolismo, así como el efecto de comorbilidades que disminuyen la funcionalidad hepática (41,42).

2.7 Métodos analíticos para la cuantificación del medicamento anticoagulante.

Se han reportado una gran variedad de métodos analíticos por cromatografía de líquidos para determinar las concentraciones del medicamento anticoagulante y sus metabolitos hidroxilados en muestras sanguíneas. Si bien se ha popularizado el uso de técnicas más sofisticadas como la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) acoplado a un detector de masas, la implementación de este tipo de metodologías involucra la utilización de una gran cantidad de insumos lo que se refleja en un incremento de los costos de análisis hasta de un 50% (\$2,358.62 vs \$1,091.38

por muestra analizada) (43). Dentro de las principales diferencias respecto al uso de la técnica de UPLC se encuentra el uso de solventes con altos grados de pureza, estándares de referencia deuterados, la instalación de gases de nitrógeno/argón y el acondicionamiento de las instalaciones. Si bien esto se ve reflejado en la alta sensibilidad del método (detección en orden de magnitud hasta de picogramos), se cuenta con la alternativa de la técnica por HPLC debido a que el orden de magnitud de los analitos de interés se encuentra en nanogramos (fácilmente detectable por esta técnica). De este modo es posible alcanzar el equilibrio perfecto entre costo-beneficio para el análisis de muestras por esta metodología analítica.

2.8 Interacciones farmacológicas

Como se mencionó previamente, la FA y las EV son patologías cuyo seguimiento requiere la prescripción de una gran cantidad de medicamentos. Los pacientes con FA suelen cursar de manera simultánea otras patologías que requieren de tratamiento adicional, por lo que la administración concomitante de medicamentos (polifarmacia) ha demostrado ser una de las principales causas del surgimiento de reacciones adversas. En el caso de la terapia con el medicamento anticoagulante, existen diferentes tipos de interacciones tanto a nivel farmacodinámico como farmacocinético que modifican la intensidad de la respuesta terapéutica dividiéndose en aquellas que potencian la actividad anticoagulante y aquellas que la disminuyen. En la tabla 3 se muestran las interacciones reportadas para el medicamento anticoagulante indicando su mecanismo de acción, así como el efecto final observado (2,15,44).

Tabla 3. Interacciones farmacológicas con el medicamento anticoagulante

| Fármaco(s) | Interacción | Mecanismo | Efecto observado |
|--|--|--|------------------|
| Interacciones Farmacocinéticas | | | |
| Ácido acetilsalicílico | Desplazamiento del medicamento anticoagulante de su sitio de unión a albumina, | Fármacos que poseen mayor afinidad por el sitio de unión a albumina desplazan a el medicamento anticoagulante incrementando la fracción de fármaco libre responsable del efecto terapéutico. | Potenciación |
| Ketoconazol, fluconazol, amiodarona, lovastatina. | Inhibición de la isoenzima CYP2C9 | Inhibición de la síntesis, o competición por los sitios activos favorece la bioacumulación del medicamento anticoagulante incrementado su tiempo de vida media. | Potenciación |
| Rifampicina, fenobarbital, carbamazepina. | Inducción enzimática de la isoenzima CYP2C9 | Aumento de su metabolismo por inducción enzimática favorece la producción de metabolitos hidroxilados (inactivos) disminuyendo el tiempo de vida media. | Disminución |
| Interacciones Farmacodinámicas | | | |
| Antibióticos, colestiramina | Disminución de la absorción de vitamina K | Algunos antibióticos de amplio espectro pueden eliminar la flora bacteriana intestinal y agravar el déficit de vitamina K, debido a que una gran parte de la vitamina K es producida por la microbiota intestinal. La colestiramina es una resina de intercambio aniónica capaz de secuestrar a las sales biliares en el tracto intestinal impidiendo que participen en el proceso de absorción de la vitamina K que es altamente liposoluble. | Potenciación |

| | | | |
|--|---|---|-------------------------------|
| Acetaminofén y cefalosporinas (2da y 3era generación) | Inhibición del ciclo de la vitamina K. | La administración de grandes dosis de acetaminofén o su uso sostenido por largos periodos de tiempo promueve el incremento de las concentraciones séricas del metabolito toxico NAPQI debido a la saturación del proceso de glucoronidación durante las reacciones de fase II en el metabolismo del acetaminofén. El NAPQI y las cefalosporinas antagoniza al igual que el medicamento anticoagulante a la VKORC1, generando un efecto sinérgico como si se tratase de un incremento en la dosis. | Potenciación |
| Diuréticos (Clortalidona y espironolactona) | Hemoconcentración de los factores de coagulación. | La producción incrementada de orina con el uso de diuréticos favorece la hemoconcentración de los factores de coagulación reduciendo el efecto del medicamento anticoagulante e incrementarse la capacidad coagulativa de la sangre. | Disminución |
| Levotiroxina | Disminución de los factores de coagulación. | Aumenta el metabolismo de los factores de coagulación disminuyendo su semivida en circulación sanguínea. | Potenciación |
| AINES | Efecto sinérgico en el desarrollo de sangrado | Los AINES son gastro lesivos y aumentan la posibilidad de sangrado gastrointestinal que puede agravarse en pacientes bajo terapia anticoagulante. | Riesgo de evento hemorrágico. |
| Antiagregantes plaquetarios (Clopidogrel) | Incremento del efecto anticoagulante | Inhiben la agregación plaquetaria incrementando el estado de anticoagulación en el paciente. | Riesgo de evento hemorrágico. |

2.9 Efecto de la dieta sobre la respuesta farmacológica.

Dado a que la vitamina K se puede obtener a partir de los alimentos, la dieta juega un papel importante en el manejo de la terapia anticoagulante. El consumo de alimentos ricos en vitamina K, principalmente los vegetales verdes (espinaca, brócoli, perejil, acelga, berro, etc.) pueden disminuir el efecto de la terapia anticoagulante(23). Se sugiere que la aportación diaria de vitamina K oscile entre 90 y 120 µg de forma constante (24,44,45) para evitar fluctuaciones en las dosis requeridas de la terapia anticoagulante. En pacientes con mal control de la anticoagulación, se ha sugerido evitar el consumo definitivo de alimentos con alto contenido de vitamina K (46)

El incremento o disminución en las concentraciones séricas de vitamina K podría manifestarse en eventos trombóticos (cuando hay un consumo incrementado de vitamina K) o hemorrágicos (cuando hay una suspensión abrupta en el consumo de estos alimentos). Se ha reportado que el consumo incrementado de vitamina K se correlaciona con un aumento en la variabilidad del INR y presentan coeficientes de variación (CV) mayores al 10% tras mediciones sucesivas del INR. Lo anterior, sugiere una monitorización más cercana en pacientes que consumen grandes cantidades de alimentos con alto contenido de vitamina K (24).

Se han reportado diferentes instrumentos que evalúan la frecuencia en el consumo de alimentos ricos en vitamina K, la "K-Card" publicada en el año 2000 por el Colegio de Farmacia y Ciencias de la salud en Boston, Massachusetts (47) y el cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) publicado en el año 2007 por la Universidad de Montreal en Francia (48), los cuales son de utilidad para estimar el consumo expresado en µg/día. El cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) propuesto y validado por Días Mendonça y cols., en el 2018, siendo uno de los más recientes publicados y desarrollado en Brasil (45) incluye un listado de 35 alimentos distribuidos entre vegetales, frutas, leguminosas y preparaciones complejas cuyo contenido en vitamina K es igual o superior a 5 µg por cada 100 g de alimento. La validación del instrumento se efectuó en pacientes bajo tratamiento con el medicamento anticoagulante, se

determinó el coeficiente de correlación entre el consumo diario de vitamina K medido por el CFC comparado con el obtenido por el recuento total de alimentos consumidos en 24 horas, obteniéndose un valor de $R^2=0.756$, $p<0.001$, por lo que podría resultar de utilidad en la estimación de la ingesta dietética de esta vitamina en la población de estudio.

Es importante resaltar que el consumo de alimentos ricos en vitamina K no está completamente contraindicado, y se ha evidenciado que un consumo por debajo de los 100 ug/día no influye en la variabilidad del INR (45), mientras que un consumo sostenido por más de 4 días de vitamina K disminuye en 0.2 unidades el INR de los pacientes ($p<0.01$), por lo que su consumo si bien no es completamente restrictivo, debe estar muy bien regulado (49).

2.10 Farmacogenética del medicamento anticoagulante

Los polimorfismos asociados a la resistencia o sensibilidad del medicamento anticoagulante tienen impacto tanto a nivel farmacocinético (CYP2C9) como a nivel farmacodinámico (VKORC1). Dada la poca prevalencia de la forma heterocigota y homocigota de este polimorfismo para la variante 2* y 3* cuya expresión fenotípica para metabolizadores lentos en población mexicana es inferior al 1% (50,51), su determinación en la población de estudio no resulta de mucho interés.

Por otro lado, el polimorfismo VKORC1 1693 (G→A) de tipo farmacodinámico se relaciona a una sensibilidad incrementada del medicamento anticoagulante debido a que los portadores de la variante polimórfica presentan una disminución de la capacidad de coagulación sanguínea al disminuir la expresión y producción de la VKORC1, por lo que a dosis estándares del medicamento anticoagulante se esperaría una reacción incrementada del efecto terapéutico en este tipo de pacientes incrementando el riesgo de sangrado (52). Su prevalencia en la población mexicana reportada por Villegas y cols, es del 47% para la forma heterocigota (GA) y 20% para la forma homocigota (AA), por lo que su determinación resulta imperativa en la población de estudio.

3. Justificación.

La FA y las EV anteceden a las dos principales causas de muerte asociadas a enfermedades no transmisibles el infarto y la insuficiencia cardíaca. El manejo terapéutico de la FA y las EV se basa principalmente en el uso de fármacos anticoagulantes como una de las principales alternativas en el manejo de estas patologías debido a su gran accesibilidad en población mexicana. La optimización del uso de este medicamento representa un reto en la práctica clínica, debido a la gran cantidad de factores que promueven la variabilidad interindividual de la respuesta farmacológica. El ajuste de la dosis ideal para un paciente bajo tratamiento anticoagulante implica un periodo de intenso cuidado y monitoreo.

El tiempo que transcurre mientras se efectúa el ajuste de dosis, el INR se encuentra fuera de rango terapéutico y el riesgo de sufrir un evento trombótico o hemorrágico está latente; por este motivo, surge la necesidad de estudiar el grado de influencia de la edad, la dosis del medicamento anticoagulante, la presencia de polimorfismos en la VKORC1 (1639), las interacciones medicamentosas, el consumo de vitamina K y las concentraciones plasmáticas del medicamento y su metabolito hidroxilado tienen sobre el INR.

La identificación de los factores que influyen en el INR, serán de utilidad para optimizar la terapia anticoagulante. La medición de los niveles plasmáticos de este fármaco y su metabolito hidroxilado, podría tener grandes implicaciones en el manejo de este medicamento disminuyendo el riesgo de aparición de reacciones adversas, así como la probabilidad de alcanzar el INR esperado en etapas tempranas del tratamiento.

4. Hipótesis.

La presencia de factores asociados a la dosificación del medicamento anticoagulante, tales como interacciones farmacológicas, interacciones dietéticas, la edad, el polimorfismo VKORC1 y las concentraciones plasmáticas del medicamento y su metabolito hidroxilado, modifican los valores del INR en pacientes con FA y EV.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

Determinar los principales factores clínicos, genéticos y nutricionales involucrados en la variabilidad del INR como marcador de la respuesta a el medicamento anticoagulante, así como su relación con las concentraciones plasmáticas de él y su metabolito hidroxilado en pacientes con FA y EV.

5.2 Objetivos específicos.

- Validar y estandarizar la técnica de cuantificación para el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado por HPLC/UV-Vis
- Determinar las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en los pacientes al inicio del estudio.
- Determinar la presencia del polimorfismo VKCOR 1693 (G→A) por la técnica de PCR en tiempo real.
- Determinar el número e importancia de las interacciones farmacológicas presentes en el esquema de medicación del paciente.
- Determinar el consumo de vitamina K expresado en $\mu\text{g}/\text{día}$ empleando un cuestionario de frecuencia de consumo (CFC).
- Determinar las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado posterior a la intervención clínica.

6. Metodología

6.1 Metodología de investigación farmacológica

6.1.1 Equipo y Reactivos

a) Equipo

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de absorbancia dual UV/Vis (equipado con desgasificador, bomba binaria y auto muestreador).
- Balanza analítica
- Potenciómetro AQUASEARCHER™
- Sistema de filtración al vacío “Millipore”.
- Ultracongelador “Thermo Scientific”
- Centrífuga refrigerada
- Concentrador de vacío
- Nanodrop Thermo Scientific
- Termociclador Applied Biosystems™ StepOne
- Incubadora de baño seco

b) Reactivos

- Estándares de referencia certificados:
 - Medicamento anticoagulante (pureza 99.8%)
 - Metabolito hidroxilado (pureza 99%)
 - Estándar interno (pureza 99%)
- Fosfato de sodio monobásico (pureza 98.1%)
- Agua desionizada, metanol y acetonitrilo (HPLC/Spec)
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.
- Sonda TaqMan™
- PCR TaqMan™ Master mix
- Agua grado biología molecular
- Etanol e isopropanol grado biología molecular

6.1.2 Estandarización del método analítico para la cuantificación del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en muestras de plasma sanguíneo.

Se desarrolló y estandarizó un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector UV-Visible para la cuantificación simultánea del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en plasma sanguíneo.

6.1.2.1 Condiciones Cromatográficas

Se efectuaron diferentes pruebas preliminares para determinar las condiciones cromatográficas que aseguraran la correcta separación del medicamento anticoagulante, su metabolito hidroxilado y el estándar interno en muestras plasmáticas.

- Fase móvil: consistió en Buffer de fosfatos, metanol y acetonitrilo en proporciones, con un sistema de bombeo isocrático a una velocidad de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L. Se empleó una columna con fase estacionaria C18.
- Longitud de onda (λ): se determinó realizando el barrido UV para cada compuesto, en un rango de 250 a 350 nm, de una solución de 50 μ g/mL de cada compuesto en fase móvil. El detector de absorbancia dual UV-Vis se ajustó a una λ de máxima absorbancia para la detección simultánea de ambos analitos y el estándar interno.
- Eficiencia de la separación cromatográfica: se determinó a partir de la forma de los picos. Se efectuó el cálculo de resolución (R_s) para evaluar el grado de separación de los analitos, tanto en agua como en plasma, empleando la ecuación de la Figura 3. Un valor de resolución mayor a 1 indica que los compuestos pueden ser cuantificados y un valor mayor de 1.5 indica que la separación es óptima.

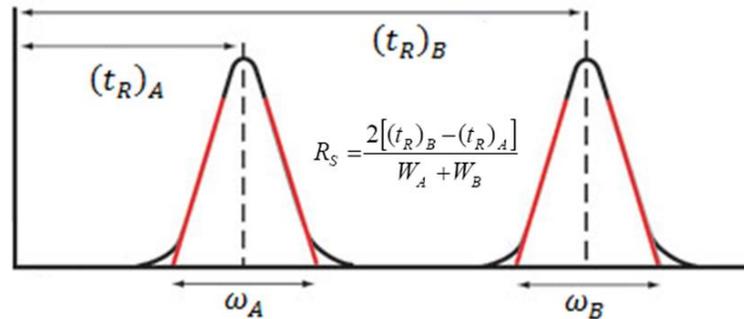


Figura 3. Ecuación cálculo de resolución entre picos.

$(T_R)_A$ Tiempo de retención del compuesto A, $(T_R)_B$ Tiempo de retención del compuesto B, W_A Anchura de la base del pico A, W_B Anchura de la base del pico B.

6.1.2.2 Estabilización del equipo

Previo a cada corrida analítica, se efectuó la purga de las bombas con la fase móvil, posteriormente se efectuó una inyección de aire para asegurar el equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se considera que una columna está en equilibrio con la fase móvil, cuando han pasado a través de ella al menos 10 volúmenes de columna. Teniendo 1 mL de volumen de columna a un flujo de 0.3 mL/min, se determinaron 20 minutos como mínimo, para efectuar este proceso. Cada día de trabajo, se evaluó la precisión del sistema inyectando por quintuplicado una solución de los estándares de referencia en solución acuosa. Se empleó una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ para el medicamento anticoagulante, el metabolito hidroxilado y el estándar interno. Una vez que los cromatogramas inyecciones se solapaban tras inyecciones sucesivas, se calculó el porcentaje de imprecisión comparando el área bajo la curva de los picos (ABC). Se consideró un valor de coeficiente de variación (%CV) inferior al 5%, para poder proseguir con el análisis.

6.1.2.3 Preparación curva de calibración y controles de calidad

Se estableció el rango de concentraciones empleados en la curva de calibración, así como la concentración de los controles de calidad de alta (MCA), media (MCM) y baja

(MCB) concentración en plasma, además del límite inferior de cuantificación (LIC) y una muestra control diluida (MCD), que fue considerada para muestras con concentraciones por encima del LIC.

Para la preparación de la curva de calibración se añadieron volúmenes crecientes de una solución de trabajo constituida por una mezcla del medicamento anticoagulante y el metabolito hidroxilado a una concentración de 10 µg/mL en plasma.

6.1.2.4 Método de extracción en muestras de plasma.

El método de extracción para el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado, consistió en precipitar las proteínas con acetonitrilo empleando agitación en vórtex y posteriormente se efectuó una centrifugación. El sobrenadante se recuperó y se evaporó al vacío hasta sequedad y finalmente fue resuspendido en fase móvil. Se realizó una última centrifugación y el sobrenadante se colocó en viales para su inyección en el equipo.

6.1.3 Validación del método analítico en plasma

La validación se apegó a los lineamientos establecidos en el apartado 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 (Validación de métodos analíticos: características de desempeño). Se evaluó la linealidad, precisión y exactitud en términos de repetibilidad y reproducibilidad, así como la selectividad, el efecto acarreo, ciclos congelación - descongelación y estabilidad, como a continuación se describe:

6.1.3.1 Linealidad

Se estableció un intervalo de concentraciones esperadas de los analitos en plasma caracterizando seis niveles de concentraciones, sin incluir las muestras blanco de matriz biológica.

Se determinó el modelo matemático adecuado a la relación entre la concentración y la respuesta analítica, la cual fue continua y reproducible en el intervalo de trabajo. Cada curva de calibración incluyó una muestra blanco de matriz biológica (sin adición de analitos) con y sin estándar interno. Fueron evaluadas tres curvas de calibración,

incluyendo los resultados de las concentraciones recuperadas y el porcentaje de desviación con respecto a la concentración nominal.

Los resultados de la concentración recuperada de la curva de calibración estuvieron dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación ya que puede ser menor o igual al 20%. Se cumplió este criterio en al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos.

6.1.3.2 Precisión

a) Repetibilidad

En un mismo día, se analizaron por quintuplicado, las muestras MCB, MCM, MCA, MCD y LIC. Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El %CV de las concentraciones obtenidas no fueron mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual fue menor o igual al 20% para método cromatográficos.

b) Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado, en tres corridas analíticas diferentes, las muestras MCB, MCM, MCA y LIC. De la misma manera, se calculó la concentración obtenida para cada nivel, interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. Se cumplió con el criterio que indica que el valor de %CV no debe ser mayor a 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20% para método cromatográficos.

6.1.3.3 Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación:

$$\%Desviación = \frac{[Obtenida] - [Nominal]}{[Nominal]} * 100$$

El valor medio del % de desviación no debe ser mayor al 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20% para métodos cromatográficos.

6.1.3.4 Selectividad

Se evaluó el efecto de los componentes del plasma sobre la respuesta de los analitos. Para ello, se utilizaron al menos 6 unidades individuales sin contener a los fármacos. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención de los analitos o el estándar interno debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación de los analitos.

a) Muestra hemolizada y lipémica

Se analizó por triplicado un blanco de plasma obtenido de una muestra lipémica y una muestra hemolizada. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención de los analitos o el estándar interno debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación de los analitos.

b) Efecto del anticoagulante

Se analizó por triplicado un blanco de plasma obtenido de una muestra recuperada en un tubo adicionado con EDTA y heparina. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención de los analitos o el estándar interno debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación de los analitos.

c) Efecto acarreo

Se realizó la inyección de la misma muestra blanco tres veces (una antes y dos después) del límite superior de cuantificación. La respuesta analítica próxima al tiempo de retención de los analitos y el estándar interno debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito.

6.3.6 Estabilidad de la muestra

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que los dos analitos permanecieron estables en la matriz biológica. Se analizaron por triplicado las muestras MCB, MCM y MCA y se compararon las concentraciones obtenidas con respecto a las concentraciones nominales.

La concentración media de cada nivel debe estar dentro del $\pm 15\%$ de desviación con respecto a la concentración nominal.

a) Estabilidad a corto, mediano y largo plazo

Se evaluó por triplicado, la estabilidad de los analitos en las muestras MCB, MCM y MCA, en la matriz biológica. Estas fueron las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -80°C , desde su obtención hasta su procesamiento.

La estabilidad se evaluó a corto plazo: en un periodo no mayor a 30 días, a mediano plazo: en un periodo de 60 a 90 días y la estabilidad a largo plazo: en un periodo de 120 días.

b) Estabilidad ciclos congelación – descongelación

Se evaluó por triplicado la estabilidad de los analitos en las muestras MCB, MCM y MCA, almacenadas a una temperatura de -80°C . Las muestras fueron sometidas a 1, 2 y 3 ciclos congelación - descongelación dejando como mínimo 12 horas en el congelador y posteriormente descongelarlas a temperatura ambiente.

6.1.4 Genotipificación PCR tiempo real acoplado a sonda TaqMan™.

Para la evaluación del polimorfismo VKORC1 (1639), se empleó la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) en tiempo real acoplado a una sonda TaqMan™. Se empleó ADN genómico extraído de sangre venosa periférica. El protocolo de extracción de ADN se había implementado previamente por el grupo de investigación.

6.1.4.1 Extracción ADN genómico

Las extracciones de ADN se realizaron empleando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega empleando sangre venosa periférica. El ADN obtenido se cuantificó empleando el equipo NanoDrop Thermo Scientific. Se evaluó la pureza del ADN extraído empleando el cociente de absorbancias 260/280, que indica que una muestra libre de agentes contaminantes (solventes o proteínas) debe tener un valor entre 1.8 y 2.0 para poder ser empleada en una reacción de amplificación.

6.1.4.2 Reacción de amplificación

Para efectuar la reacción de amplificación se empleó el templado de ADN obtenido de cada muestra, el cual se mezcló con la sonda TaqMan específica del polimorfismo a detectar y se añadió el reactivo comercial “PCR TaqMan™ Master mix”, el cual incluía todos los componentes para efectuar la reacción.

6.1.4.3 Condiciones termociclador

En la figura 5 se observa el programa de termociclado para efectuar la reacción de amplificación.

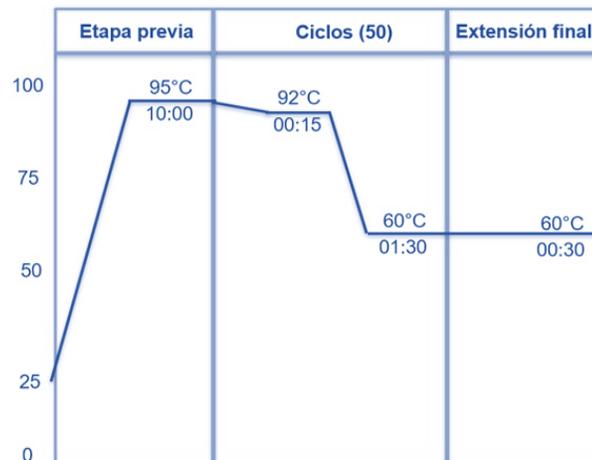


Figura 4. Gráfico de temperaturas para reacción de amplificación.

6.2 Metodología investigación clínica

6.2.1 Diseño del estudio

Cohorte prospectiva con un seguimiento no mayor a 30 días.

6.2.2 Lugar de realización

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis potosí.

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P.

6.2.3 Universo de estudio

Pacientes con diagnóstico de FA o EV que se encuentren bajo tratamiento con el medicamento anticoagulante.

6.2.4 Método de muestreo

Consecutivo por conveniencia

6.2.5 Tamaño de muestra

Dado que no se conocen cómo se modifican el INR en función de las variables de estudio, se sugiere un análisis de regresión multivariada que considera como mínimo 10 pacientes por variable explicativa. Con un total de 5 variables continuas y 1 variable categórica (dicotómicas) se determinó un total de 60 pacientes para el diseño del modelo propuesto.

6.2.6 Criterios de selección

Inclusión:

- Pacientes de ambos sexos ≥ 18 años
- Pacientes en terapia ambulatoria
- Diagnóstico de fibrilación auricular valvular o no valvular
- Pacientes con prótesis valvulares
- Pacientes con enfermedad valvular
- Inicio de su tratamiento con el medicamento anticoagulante por lo menos de 1 mes.

- Pacientes que acepten participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado.

No inclusión:

- Pacientes que presenten sobre anticoagulación (INR>6)
- Pacientes bajo tratamiento con el estándar interno durante la realización del estudio.
-

Eliminación:

- Retiro del consentimiento informado.
- Inconvenientes o dificultad para tomar o procesar la muestra.
- Pacientes en los que no se pudieron obtener las variables de interés
- Pacientes que durante el periodo de seguimiento de 30 días presenten hospitalización, complicaciones cardiovasculares o muerte.

6.2.7 Plan de trabajo

El reclutamiento de los pacientes se efectuó mediante la divulgación de una infografía. La divulgación de dicho material contó con la aprobación del Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud contando con la aprobación de su respectiva enmienda.

Se invitó a participar en el estudio a los pacientes que cumplieran con los criterios de selección previamente indicados; su participación fue voluntaria mediante la firma de consentimiento informado.

Los sujetos en este estudio se encontraban en equilibrio dinámico respecto a las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, es decir, iniciaron su tratamiento con el medicamento anticoagulante con al menos un mes de antelación previo a la inclusión del estudio y mantenían su régimen posológico indicado por el medico en función de su diagnóstico y características clínicas.

Previa valoración, los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a un breve cuestionario para obtener datos relacionados a su historia clínica, edad,

comorbilidades, medicamentos concomitantes y CFC. Se determinó el Índice de Charlson empleando una calculadora virtual (<https://www.samiuc.es/indice-de-comorbilidad-de-charlson-cci/>) (53), en la cual se colocó la edad de los pacientes y comorbilidades.

El día del estudio, los pacientes fueron medidos (estatura), pesados y se tomaron dos muestras sanguíneas. Una muestra fue recolectada en un tubo adicionado con EDTA y otra en un tubo adicionado con citrato. Al estar en equilibrio dinámico las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, la toma de ambas muestras se efectuó como mínimo 12 h post-dosis para asegurar el proceso de absorción y distribución del medicamento.

Se mantuvo contacto con los pacientes durante el periodo de seguimiento de 30 días y fueron citados una segunda vez para realizar nuevamente la toma de una muestra sanguínea recolectada en un tubo de EDTA y citrato.

6.2.8 Análisis de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1300 rpm a 4°C por 20 minutos para separar el plasma y posterior conservación a -80°C hasta el día de su análisis por el método HPLC-UV/Vis.

La segunda muestra obtenida en la primera visita se conservó a 4°C y se procedió a la extracción de ADN genómico en un periodo no mayor a 7 días. El ADN obtenido se almacenó a 4°C hasta el día del análisis por la técnica de PCR tiempo real.

Los tiempos de coagulación (TP e INR) de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio fueron analizadas por el laboratorio de análisis clínicos “Dr. Pedro Medina de los Santos” en la Facultad de Ciencias Químicas.

6.2.9 Evaluación ingesta dietética de vitamina K

Se empleó el CFC propuesto por Días M. y cols. (2018) (45). A los pacientes con consumo superior a 120 µg/día basado en los resultados de su cuestionario se les indicó cuales alimentos podrían reducir su consumo buscando disminuir su ingesta total a un consumo promedio de 120 µg/día para hombres y 90 µg/día para mujeres.

6.2.10 Detección de interacciones medicamentosas

Del expediente clínico, se obtuvo el listado de medicamentos que cada paciente consumía en concomitancia con el medicamento anticoagulante. Se recuperó la información necesaria para realizar el análisis de interacciones considerando el nombre del medicamento, el o los principios activos, la forma farmacéutica, presentación y el régimen posológico indicado por el médico.

El análisis de los datos se efectuó empleando la base de datos “Micromedex” (<https://www.micromedexsolutions.com>)(54). La modificación en el esquema de medicación se efectuó por parte del médico y las acciones correctivas consistieron en suspender la ingesta del o los medicamentos implicados, indicando alternativas terapéuticas similares que no presentaran interacción. En los casos donde no fue posible la suspensión y/o sustitución, se procedió a modificar el régimen posológico, espaciando la toma de los medicamentos involucrados.

6.2.11 Cuadro de variables

Tabla 4. Cuadro de operacionalización de variable

| Variable | Definición operacional | Valores posibles | Unidades | Tipo de variable |
|---|--|------------------|----------|------------------|
| Dependientes | | | | |
| Índice normalizado internacional (INR) | Forma estandarizada del tiempo de protrombina Método de determinación: Automatizado – Coagulómetro | 1 - 8 | N/A | Continua |
| Independiente | | | | |
| Índice de comorbilidad de Charlson | Escala de estimación de la esperanza de vida a diez años en función de la edad y el número de comorbilidades que presenta un determinado sujeto. | 0 - 39 | N/A | Continua |
| Concentración plasmática total del medicamento anticoagulante. | Relación entre la cantidad de fármaco y su volumen de distribución Método de determinación (HPLC/UV-Vis). | 100 – 4000 | ng/mL | Continua |
| Concentración plasmática total de metabolito hidroxilado | Relación entre la cantidad de fármaco y su volumen de distribución Método de determinación (HPLC/UV-Vis) | 100 – 4000 | ng/mL | Continua |
| Interacciones farmacológicas | Número de interacciones detectadas en el esquema de polimedicación del paciente. | 0 - 25 | N/A | Continua |
| Consumo de vitamina K | Consumo aproximado de vitamina K al día. Cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) | 0 – 1000 | ug/día | Continua |

| | | | | |
|---|--|--|-------------------|------------|
| Polimorfismo VKCOR1 1693 | Variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base. Polimorfismo implicado en la sensibilidad a el medicamento anticoagulante. Método de Determinación: PCR tiempo real. | 1) Ausente 2) Presente | N/A | Dicotómica |
| Ratio metabólico | Relación entre la forma inalterada del fármaco y su principal metabolito. Se expresa como el cociente de las concentraciones del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado. | 0 - 100 | N/A | Continua |
| Variables de control o exploratorias (Se obtendrán del expediente clínico) | | | | |
| Sexo | Identificación que se le hace al paciente para diferenciar si pertenece al sexo masculino o femenino. | 1) Masculino 2) Femenino | N/A | Dicotómica |
| Edad | Es el número de años cumplidos según la fecha de nacimiento. | 18 – 80 | Años | Continua |
| IMC (Índice de masa corporal) | Relación del peso por unidad de superficie corporal. | 16 - 45 | Kg/m ² | Continua |
| Escala HAS-BLED | Parámetro que indica el riesgo de padecer en un año un evento hemorrágico importante. | 1) Riesgo bajo 2) Riesgo moderado 3) Riesgo alto | N/A | Categorica |
| Albumina sérica | Relación entre la cantidad de albumina y el volumen sanguíneo. | 2 – 6 | g/dL | Continua |

6.2.12 Análisis estadístico

a) Análisis descriptivo

Se evaluó la distribución de las variables cuantitativas con las pruebas de Shapiro-Wilks y cuartil-cuartil. Las variables con distribución normal fueron presentadas como medias y desviación estándar; y las de distribución no normal como medianas y rangos intercuartílicos. Las variables categóricas a partir de frecuencias o porcentajes.

b) Análisis inferencial

Se efectuó la prueba de ANOVA para datos no paramétricos (prueba de Kruskal Wallis) para evaluar las diferencias en la dosis de mantenimiento y el INR estratificados con base en al polimorfismo VKORC1 1639, formando 3 grupos con base a la presencia de las 3 variantes (GG, GA y AA). Se efectuó un análisis post hoc empleando la prueba de Dunns para realizar la comparación entre grupos.

Se realizó análisis de correlación univariada para determinar el grado de asociación entre el INR y las variables de estudio. Se empleó la prueba de Pearson para los datos con distribución normal y la prueba de Spearman para datos no paramétricos.

Finalmente, y con base en los resultados anteriores, se efectuó un análisis de regresión lineal multivariada para explicar la variabilidad del INR en función de las variables de estudio:

INR ~ Índice de Comorbilidad de Charlson + Dosis + Índice metabólico + Vitamina K ($\mu\text{g}/\text{día}$) + Interacciones farmacológicas + VKCOR1 1693 (G \rightarrow A).

Todos los análisis fueron realizados en RStudio versión 1.1.453 y en el software GraphPad Prism® versión 5.0 considerándose como significativo un valor de $p < 0.05$. Este último también se empleó para la construcción de los gráficos.

6.2.13 Aspectos éticos

Aprobación por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, así como la aprobación por parte del Comité Estatal de Ética en investigación en Salud. Además, se realizó el registro del protocolo ante el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas “CEID-FCQ” .

7. Resultados

7.1 Estandarización del método analítico de cuantificación

Se desarrolló, estandarizó y validó un método para la cuantificación simultánea en plasma del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector UV-Vis.

7.1.1 Condiciones cromatográficas.

Las condiciones finales obtenidas se establecieron en función de la forma y resolución de los picos las cuales fueron evaluadas tanto en agua como en plasma.

7.1.2 Cromatograma en agua.

El tiempo de la corrida analítica necesario para la elución de todos los compuestos fue de 10 min. El orden de elución en función de la polaridad de las moléculas fue en primer lugar el estándar interno, seguido del metabolito hidroxilado y finalmente el medicamento anticoagulante.

La resolución entre el estándar interno y el metabolito hidroxilado presentó un valor de 2.54 y de 1.71 entre el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado. En ambos casos dicho valor indica una separación óptima de los compuestos, lo que indica que pueden ser cuantificados bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

7.1.4 Cromatograma en plasma.

El tiempo de la corrida analítica necesario para que eluyan todos los compuestos fue de 9 min. El orden de elución en función de la polaridad de las moléculas fue en primer lugar el estándar interno, seguido del metabolito hidroxilado y finalmente el medicamento anticoagulante.

La principal diferencia del cromatograma con respecto a la mezcla en agua es el pico de plasma correspondiente a los componentes que no pudieron ser eliminados de la matriz biológica, tras el procedimiento de extracción. Dicho pico no interfiere con

ninguno de los analitos, ni con el estándar interno, al mostrar un tiempo de retención menor.

El cálculo del factor de resolución, indica que la separación cromatográfica de los picos se mantiene en dicha matriz biológica. Los factores de resolución obtenidos entre el estándar interno, el metabolito hidroxilado y el medicamento anticoagulante fueron 2.12 y 1.62 respectivamente. Dichos valores indican que la eficiencia de la separación de los picos es óptima para efectuar su cuantificación.

7.2 Validación de la técnica de bioanálisis

7.2.1 Linealidad en matriz biológica de plasma

El método propuesto demostró ser lineal en la matriz biológica al obtener coeficientes de determinación de 0.9996 y 0.9998 para el medicamento anticoagulante y el metabolito hidroxilado respectivamente en los cuales se caracterizaron 6 diferentes niveles de concentración.

7.2.2 Precisión y exactitud

El método analítico resultó ser preciso bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad al obtenerse un %CV<15% en las MCB, MCM, MCA y MCD y un CV<20% para el LIC.

Con los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad se obtuvieron valores de desviación dentro del $\pm 15\%$ respecto a las concentraciones nominales de cada control y $\pm 20\%$ para el LIC, demostrando que el método desarrollado es exacto para cada analito tanto en condiciones de repetibilidad como reproducibilidad.

7.2.4 Selectividad

El método demostró ser selectivo para la matriz biológica (plasma) al no mostrar interferencias cercanas al tiempo de retención de los analitos y el estándar interno.

El tipo de anticoagulante con el cual se recolecta la muestra (EDTA y heparina), así como el tipo de muestra (hemolizada y lipémica), y el efecto acarreo tampoco mostraron la presencia de interferencias.

No se observaron interferencias superiores al 20% del área bajo la curva respecto al LIC.

7.2.5 Estabilidad de la muestra

Se demostró la estabilidad de la muestra 30, 60, 90 y 120 días en condiciones de almacenamiento a -80°C , calculando el porcentaje de desviación con respecto a la concentración nominal de los controles de calidad de MCB, MCM y MCA. Se observó que las muestras se mantienen estables por un periodo de 120 días bajo condiciones de almacenamiento. También se demostró que la muestra tolera 3 ciclos congelación-descongelación al mantener una desviación dentro del $\pm 15\%$ respecto a la concentración nominal de las tres muestras control.

7.3 Estudio clínico

7.3.1 Características demográficas y clínicas de la población

Se incluyeron pacientes (64% mujeres), con rango de edad entre 33 a 72 años, residentes actuales del estado de San Luis Potosí, bajo tratamiento crónico con el medicamento anticoagulante. La totalidad de los pacientes recibían atención médica de manera ordinaria en una institución pública .

El motivo de la prescripción del medicamento anticoagulante de los pacientes incluidos en el estudio se clasificó en 3 grupos; reemplazo valvular aórtico, reemplazo mitral y FA valvular. La hipertensión arterial la comorbilidad más frecuente. Los antecedentes no patológicos como alcoholismo y tabaquismo mostraron una frecuencia muy baja.

La media inicial del INR en la primera entrevista fue de 2.28; 68.2% de los pacientes no alcanzó el objetivo terapéutico dado que el INR no se ubicó dentro del intervalo deseable (2.0 a 3.5). La dosis de mantenimiento inicial del medicamento anticoagulante tuvo una media de 24.1 mg/semana y la media del periodo de seguimiento de los pacientes fue de 33 días.

Los valores obtenidos durante la segunda visita fueron 2.63 para el INR, una dosis de mantenimiento de 25 mg/semana y un 45.5% de pacientes dentro de rango terapéutico.

Los pacientes que no se ubicaron dentro de rango terapéutico recibieron un ajuste de dosis basado en los valores del INR obtenidos durante la primera visita, 46% de ellos recibieron un incremento de la dosis semanal ($\text{INR} < 2$) y el 54% restante una disminución ($\text{INR} > 3.5$).

7.3.2 Concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y el metabolito hidroxilado.

Se monitorizaron las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado La media de los valores de concentración para ambos analitos durante la primera visita fue de 2.34 y 0.159 $\mu\text{g/mL}$ para el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado, respectivamente. Durante la segunda visita

fue de 2.35 y 0.161 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado, respectivamente. Se obtuvo el ratio metabólico como el cociente de ambas concentraciones obteniendo un valor de 21.8 para la primera visita y 30.6 para la segunda visita.

Se efectuó un análisis de regresión univariada para determinar el grado de asociación entre las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, el metabolito hidroxilado y el ratio metabólico con la dosis del medicamento anticoagulante.

Se observa que las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante respecto a la dosis de mantenimiento tienen un coeficiente de correlación de 0.45 y 0.64 para la visita 1 y 2 respectivamente, ambos con significancia estadística ($p > 0.05$), mientras que las concentraciones plasmáticas del metabolito y el ratio metabólico no resultaron ser significativas respecto a la dosis de mantenimiento.

7.3.3 Genotipificación del polimorfismo VKORC1

El análisis de genotipificación se efectuó en todos los pacientes incluidos en el estudio observando un incremento de la fluorescencia respecto a la fluorescencia basal del control negativo. La genotipificación mostró la presencia de las 3 variantes polimórficas en la población de estudio.

Se compararon las frecuencias genotípicas observadas respecto a las reportadas en el estudio de Villegas y cols. (2015), efectuado en 300 mexicanos mestizos pertenecientes a los estados de Guanajuato, Guerrero, Yucatán, Zacatecas, Veracruz y Sonora (51). Se observan frecuencias muy similares a los reportados en el presente estudio.

Se efectuó el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg calculando las frecuencias alélicas observadas y esperadas. Se observa que la población estudiada se encuentra en equilibrio.

Se estratificó a los pacientes en función de su genotipo y se analizó su relación con la dosis de mantenimiento del medicamento anticoagulante expresada en mg/semana. Se observan diferencias significativas cuando se comparan los pacientes con genotipo “GG” y el genotipo “AA”, lo que indica que los pacientes pertenecientes a este último requieren dosis de mantenimiento más bajas con respecto a los no presentan el polimorfismo. Esta relación que se vuelve aún más significativa durante la visita 2 posterior a la modificación de dosis que se efectuó con base en los valores del INR.

Los valores del INR también se estratificaron en función del polimorfismo. En la figura 14.A se observa que durante la visita 1 los pacientes con la variante polimórfica AA poseen valores más altos en comparación a la variante GG. Posterior al ajuste de dosis en la visita 2 esta tendencia desaparece.

7.3.4 Detección de interacciones medicamentosas

Se detectó un total de 123 interacciones en el esquema de medicación de todos los pacientes incluidos en el estudio (73% se encontraba en polifarmacia). Del total de interacciones observadas poco más de la tercera parte (37.3%) corresponde a interacciones con el medicamento anticoagulante, con una mediana de 1.5 y un rango de 1 a 7 interacciones.

La clasificación de las interacciones con el medicamento anticoagulante en función de su severidad mostró que poco más de la tercera parte posee una severidad moderada, asociados principalmente a diuréticos, mientras que las de severidad mayor se asociaron a medicamentos inhibidores del metabolismo hepático. Finalmente, las de severidad menor se asociaron mayoritariamente a medicamentos que disminuyen la vida media de los factores de coagulación.

La clasificación de las interacciones en función de su mecanismo de acción, farmacocinético o farmacodinámico, mostraron proporciones muy similares, 42.5% y 57.4%, respectivamente. Las de tipo farmacocinético se asociaron más a la presencia de medicamentos que interferían a nivel hepático con el metabolismo del medicamento anticoagulante, inhibiendo a las isoenzimas del citocromo p450 como el alopurinol, el

omeprazol, la amiodarona y la glibenclamida. Las interacciones de tipo farmacodinámico se asociaron principalmente a medicamentos que interfieren con los factores de coagulación, ya sea inhibiendo su metabolismo (levotiroxina) o favoreciendo su incremento o disminución en el plasma sanguíneo (clortalidona y espironolactona).

Finalmente, la clasificación de las interacciones en función del efecto observado mostró una mayor frecuencia en aquéllas que producen una potenciación del efecto anticoagulante (74%) a diferencia de aquéllas que producen una disminución de este (26%), sin embargo, 8 pacientes (36%) presentan dentro de su mismo esquema de medicación ambas interacciones (potenciación y disminución), por lo que el efecto final observado entre interacciones se podría contrarrestar.

7.3.5 Determinación del consumo de vitamina K

Se determinó la ingesta dietética de vitamina K de todos los pacientes incluidos en el estudio, obteniendo una media de 36.7 ± 23.2 $\mu\text{g}/\text{día}$. El consumo se estratificó en los 6 diferentes grupos de alimentos que el CFC evalúa. Se determinó que el grupo con mayor aporte de vitamina K corresponde a los vegetales y frutas, mientras que las grasas y las carnes resultaron ser el grupo de alimentos con menor aporte de vitamina K. Durante la realización del cuestionario, se les interrogó a los pacientes si tenían conocimiento previo sobre la restricción en el consumo de alimentos ricos en vitamina K, al respecto, el 100% de los participantes indicó que en su institución de salud fueron orientados con asesoría nutricional.

7.3.6 Análisis de regresión univariada

Se evaluó el grado de asociación entre cada covariable y el INR mediante un análisis de regresión univariada con los datos obtenidos de la visita 1 y visita 2. No se obtuvo ninguna covariable significativa.

Adicionalmente se evaluó la correlación entre las covariables y la magnitud del cambio observado en el INR (Delta INR). La única covariable que resultó ser significativa es el delta INR con la dosis de mantenimiento con un valor de $r=0.64$ y $p=0.002$.

7.3.7 Análisis de regresión multivariada

Posterior a observar el efecto de las covariables de forma independiente con el INR, se procedió al análisis de regresión lineal multivariada. Dada las limitaciones de la muestra (n=22), la construcción de los modelos de regresión se definió estableciendo como máximo 3 covariables explicativas de la variable dependiente (INR) para cada modelo, si una variable de las tres no presentaba significancia, se eliminó la que presentaba mayor valor de p y se sustituyó por otra variable para correr un nuevo modelo;

$$INR \sim Xa + Xb + Xc$$

Se construyeron 3 diferentes modelos, dos empleando los valores de INR obtenidos de la primera y segunda visita, y un tercero empleando los deltas de dichas variables. Los deltas fueron calculados como la diferencia de los valores obtenidos en la segunda visita menos los obtenidos en la primera visita.

Los modelos construidos cumplieron la condición de tener como máximo 3 covariables explicativas, por lo cual fue se evaluó cada una de las posibles combinaciones entre ellas.

Los modelos de mejor ajuste se eligieron con base al número de covariables significativas ($p < 0.05$) y coeficiente de determinación más elevado (R^2). Los modelos elegidos se describen a continuación.

7.3.7.1 Modelo “Visita 1”

Por análisis de regresión lineal múltiple se evaluó la variabilidad del INR empleando los datos obtenidos durante la visita 1. El modelo de mejor ajuste incluyó a las covariables: Dosis del medicamento anticoagulante, concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y el polimorfismo genético VKORC1 1639.

En este modelo el polimorfismo genético muestra una asociación positiva con el INR ($p=0.001$, $\eta^2=0.513$) además de las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, mientras que con la dosis del medicamento anticoagulante mostró una asociación negativa. Estas dos últimas covariables no presentaron significancia

estadística. El modelo completo mostró significancia estadística ($p=0.002$) y logra explicar el 58.4% de la variabilidad del INR.

7.3.7.2 Modelo “Visita 2”

Por análisis de regresión lineal múltiple se evaluó la variabilidad del INR empleando los datos obtenidos durante la visita 2. El modelo de mejor ajuste incluyó a las covariables: Índice de Charlson, concentración plasmática del medicamento anticoagulante y la concentración plasmática del metabolito hidroxilado.

En este modelo las tres covariables muestran una asociación positiva y significativa con el INR ($p<0.05$) y el modelo completo logró mostrar significancia estadística y explica el 70.8% de la variabilidad del INR, indicando que la edad y las comorbilidades (incluidas en el ICH), así como las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y su metabolito podrían considerarse como los mejores predictores de la respuesta terapéutica a el medicamento anticoagulante.

7.3.7.3 Modelo “Deltas”.

Por análisis de regresión lineal múltiple se evaluó la variabilidad del delta observado en el INR. El modelo de mejor ajuste incluyó a las covariables: Índice de Charlson, el delta de las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y delta de la dosis del medicamento anticoagulante.

En este modelo las covariables ICH y DeltaCPW muestran una asociación positiva y significativa con el delta del INR ($p<0.05$). Se observa que la covariable DeltaCPW, se encuentra en el límite de la significancia ($p=0.055$), sin embargo, al ser una variable que se correlaciona directamente con la clínica se optó por mantenerla dentro del modelo. El modelo completo logró mostrar significancia estadística ($p=0.002$) y logra explicar el 37.2% de la variabilidad del delta en el INR.

8. Discusión de resultados

En el presente estudio se implementó un método de cuantificación por la técnica de HPLC para la determinación de las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y metabolito hidroxilado. Si bien se ha popularizado el uso de técnicas más sofisticadas como la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) acoplado a un detector de masas, la implementación de este tipo de metodologías involucra la utilización de una gran cantidad de insumos lo que se refleja en un incremento de los costos de análisis de hasta un 50% (43).

Dentro de las principales diferencias respecto al uso de la técnica de UPLC se encuentran el uso de solventes con altos grados de pureza, estándares de internos deuterados, la instalación de gases de nitrógeno/argón y el acondicionamiento de las instalaciones. Si bien esto se ve reflejado en la alta sensibilidad y especificidad del método (detección en orden de magnitud de hasta picogramos), se optó por la técnica de HPLC debido a que el orden de magnitud de los analitos de interés se encuentra en nanogramos, fácilmente detectable por esta técnica (55). De este modo es posible alcanzar el equilibrio perfecto entre costo-beneficio para el análisis de muestras por esta metodología analítica.

Para el método analítico se tomó como referencia el trabajo publicado por Locatelli y cols. (41), el cual se optimizó y adaptó a las necesidades del estudio. Dentro de las principales modificaciones realizadas al método fue ajustar el pH de la fase móvil, la longitud de onda del detector, el gradiente de disolventes y el flujo. Dichas modificaciones permitieron obtener tiempos de corrida menores y un menor gasto de insumos.

Respecto al método de extracción en muestras de plasma, la gran mayoría de las técnicas publicadas hace uso de extracción en fase sólida (39,42,56), lo que da ventaja a emplear volúmenes más pequeños de muestra; sin embargo, involucra costos mayores. Gran parte de los estudios reportados que no emplean fase sólida

(18,41,57,58) requieren la utilización de grandes volúmenes de muestra (hasta 1 mL de plasma), siendo esta una ventaja del método propuesto ya que no se emplea fase sólida y el volumen de plasma requerido es muy pequeño.

Además de las ventajas del método de bioanálisis estandarizado, se demostró que es lineal, preciso y exacto en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Se cumplieron con los criterios de validez señalados por la NOM-177-SSA-2013 (59), indicando que el método implementado es aceptable para el análisis de muestras plasmáticas de pacientes en tratamiento con el medicamento anticoagulante.

Se determinó que las muestras son estables durante un periodo de 120 días almacenadas a una temperatura de -80°C. Dadas las limitaciones de tiempo para la realización de este estudio solo fue posible evaluar 4 meses, sin embargo, Locatelli y cols. reportan una estabilidad a largo plazo hasta de 15 meses a una temperatura de -20°C para ambos, el medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado. Para los fines del presente estudio, 4 meses se consideró como un periodo razonable para analizar la muestra posterior a su recolección, por lo que sería interesante evaluar un periodo de tiempo más largo para hacer una comparación directa con dicho estudio. El análisis de estabilidad también indicó que las muestras son estables después de 3 ciclos de congelación – descongelación similar a los reportado por Zuo y cols., tolerando de igual forma, 3 ciclos congelación – descongelación de 24 horas cada uno, empleando las mismas condiciones de almacenamiento a -80°C.

En la fase clínica se observó mayor prevalencia de EV con respecto a FA (4:1); las EV se distribuyeron en remplazo mecánico mitral y aórtico concordando con lo reportado por Aluru y cols. en el 2022, donde se establece que en el contexto mundial las EV más frecuentes son la insuficiencia mitral (24 millones de casos) y la estenosis aórtica (9 millones de casos) (60).

Durante la primera visita y con base en el INR, el 68% de los pacientes se encontraba fuera de rango terapéutico, observando proporciones similares de aquellos que requirieron un incremento de la dosis con respecto a los que se les disminuyó; lo anterior, evidencia la necesidad de individualizar la dosis del medicamento anticoagulante de manera estrecha en pacientes con afecciones cardiovasculares. Posterior a la intervención, el porcentaje de paciente dentro del rango terapéutico para INR, incrementó un 15%, sin embargo, 11 pacientes aun continuaban con valores de INR fuera de rango terapéutico, evidenciando que los ajustes de dosis basados solamente en el INR no son totalmente efectivos.

Esto se demuestra de manera similar en el estudio desarrollado por Schulman y cols. en el cual participaron 160 pacientes con INR estable sin ajustes de dosis en los últimos 3 meses con valores de INR fuera de rango terapéutico. Fueron divididos en dos grupos, al primer grupo no se le efectuó ajuste de dosis y al segundo se le efectuó ajuste de dosis basado en los valores del INR.

El porcentaje fuera de rango terapéutico fue de 29.7% para aquellos a los cuales no se les ajustó la dosis y de 25.7% para aquellos a los que si se les modificó. Se observa que los ajustes de dosis empíricos basados en el INR no generan un gran cambio en la tasa de éxito terapéutico. Lo anterior también se puede asociar con altos porcentajes fuera de rango terapéutico (<60%) que las instituciones de salud reportan en este tipo de pacientes (4,5,61), indicando que las fluctuaciones en los niveles de INR no dependen únicamente de la dosis del medicamento anticoagulante.

Una de las principales limitantes del presente estudio fue que no se unificaron los tiempos de muestreo de todos los pacientes. Sin embargo, se estableció que el tiempo de la toma de muestra fuera como mínimo 12 h post dosis, de modo que se aseguró el periodo de absorción y distribución del medicamento, cuya duración esta reportada entre 4 y 7 horas (16). El régimen posológico indicado para el medicamento anticoagulante es de 1 toma cada 24 horas, por lo que los pacientes suelen realizar la administración del medicamento por las mañanas o por la noches. Esta situación puede representar un posible sesgo de los resultados obtenidos al no unificar la

administración del medicamento a una misma hora. Sin embargo, estudios previos han reportado que, una vez alcanzado el estado estacionario, el horario de la toma del medicamento no influye en la variabilidad del INR y no se encuentra relacionado con valores del INR fuera de rango terapéutico (62), lo anterior descarta que la hora de administración haya implicado un sesgo en la obtención de los datos durante la realización del estudio.

Se obtuvieron valores medios de las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, $2.34 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$ para la visita 1 y de $2.35 \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$ para la visita 2 y coinciden con los resultados previos de Kumar y cols., y Kulkarni y cols., quienes reportan una media de 3.47 ± 1.87 (n=178) y 3.01 ± 2.48 (n=25) respectivamente (56,63). En ambos estudios se empleó la técnica de HPLC para efectuar la cuantificación.

El análisis de correlación entre las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y el INR mostró coeficientes de determinación en el orden de $R^2=0.018$ (p=0.47) para la visita 1 y $R^2=0.189$ (p=0.06) para la visita 2. Dichos resultados son similares a los reportados por Gemmati y cols., Lombardi y cols. y Sun y cols. (17,38,60), los cuales reportan $R^2=0.04$, $R^2=0.25$ y $R^2=0.3$ respectivamente, indicando de igual forma la baja asociación entre estos dos parámetros.

La media obtenida de la concentración plasmática del metabolito hidroxilado fue de 0.159 ± 0.096 y $0.161 \pm 0.114 \mu\text{g/mL}$ para la visita 1 y 2 respectivamente. Se observan concentraciones similares a las reportadas por Locatelli y cols. (41), los cuales aplicaron una metodología por HPLC. Dichos autores reportan una media de concentraciones de $0.154 \pm 0.073 \mu\text{g/mL}$ (n=204). A manera de contraste Zuo y cols. (64) al emplear la técnica de UPLC masas/masas para la cuantificación del metabolito hidroxilado reportan una media de $0.116 \pm 0.066 \mu\text{g/mL}$ (n=30). Pese a la diferencia de las técnicas analíticas empleadas, se observan valores muy similares.

Se observó que la correlación entre la dosis de mantenimiento semanal y su metabolito hidroxilado poseen coeficientes de determinación muy bajos, $R^2=0.131$ ($p=0.11$) para la visita 1 y $R^2=0.058$ ($p=0.334$) para la visita 2. Esta relación se podría explicar según lo reportado por Kumar y cols. (56), que indica que los pacientes bajo una dosis de mantenimiento (menor a 2.5 mg/diarios) presentan una tendencia a producir mayores cantidades de metabolito hidroxilado, mientras que en los pacientes con una dosis de mantenimiento más alta (mayor a 8.5 mg/diarios) la concentración del metabolito ya no incrementa. Kumar y cols., discuten que el proceso de metabolismo hepático del medicamento anticoagulante es un proceso saturable, razón por la cual no es posible observar un incremento en la producción de metabolito si la concentración del medicamento anticoagulante también aumenta. De manera clínica esto explicaría la razón por la que los pacientes con dosis de mantenimiento alto pueden llegar a generar una respuesta terapéutica incrementada de manera espontánea, lo que implicaría que la vía metabólica en esta paciente se encuentra saturada, lo que favorece la bioacumulación del medicamento anticoagulante.

Respecto al polimorfismo estudiado, éste tiene una implicación farmacodinámica, es decir no modifica los niveles plasmáticos del fármaco, si no que promueve una disminución en la expresión de la enzima epóxido reductasa, diana terapéutica del medicamento anticoagulante. El medicamento anticoagulante establece una inhibición parcial de esta enzima, por lo que, al verse reducida su expresión, se producirá una inhibición total que genera una respuesta farmacológica incrementada. Se determinó la presencia de las 3 variantes genotípicas del polimorfismo VKORC1 (1639) en la población de estudio. Las frecuencias genotípicas obtenidas para las variantes GG, GA y AA fueron de 36, 50 y 14%, respectivamente. Al respecto, Villegas y cols. (27), al realizar un estudio en población mexicana, reportaron una frecuencia de 33% para la variante GG, 47% para la variante GA y 20% para la variante AA. Con las frecuencias obtenidas se efectuó el análisis de Hardy-Weinberg ($p=1$) indicando que la población de estudio se encuentra en equilibrio y sigue los principios de herencia mendeliana.

La estratificación de los grupos en función de su genotipo y la dosis de mantenimiento semanal con los datos obtenidos de la visita 1 reveló que los pacientes con la variante GG requieren de una dosis mayor (30 ± 10.6 mg) comparado con la variante AA, que requiere una dosis menor (12.5 ± 2.5 mg). Las diferencias de la dosis de mantenimiento en ambos grupos mostraron significancia estadística ($p < 0.05$), similar a lo reportado por Cavallari y cols., con datos de 50 pacientes hispanoamericanos (89% de ascendencia mexicana). Los autores no sólo observaron una diferencia significativa en la dosis de mantenimiento de las variantes GG y AA, sino también al comparar la variante GG con GA. donde no solo se observó una diferencia significativa en la dosis de mantenimiento de las variantes GG y AA, sino también al comparar la variante GG con GA. Por la diferencia en el número de participantes, en el presente estudio esta diferencia no pudo ser detectada (65).

Posteriormente con los datos obtenidos en la visita 2, dicha relación se volvió aún más significativa ($p < 0.01$), ya que, posterior a la intervención en los pacientes, se observó un ligero incremento de la dosis para los individuos pertenecientes al genotipo GG (32.5 mg ± 11.2) y una ligera disminución para los individuos del genotipo AA (10.8 ± 2.6 mg). Li y cols. (66) señalan que la detección de este polimorfismo toma gran relevancia en aquellos pacientes que inician su terapia anticoagulante; de manera usual las guías de práctica clínica sugieren iniciar el tratamiento con el medicamento anticoagulante empleando una dosis estándar de 5 mg/día (18), por lo que los pacientes con la variante alélica AA podrían incrementar el riesgo de sangrado durante los primeros días de tratamiento. En tales circunstancias, la detección de este polimorfismo permitirá ubicar en cual rango de dosis es factible iniciar dicho tratamiento.

Adicionalmente se efectuó el análisis del INR estratificándolo en las tres variantes del polimorfismo. Durante la visita 1 se observó que los pacientes con la variante AA presentaron valores de INR mayores comparados con los de la variante GG ($p < 0.05$). Ye y cols. (67), señalaron que en pacientes de origen chino la variante AA es superior

al 80%. Estos pacientes al iniciar su terapia anticoagulante durante la fase de estabilización tienden a presentar valores superiores de INR (1.87 ± 0.14) en comparación a la variante GA (1.32 ± 0.15). En dicho trabajo se discute que una vez alcanzada la fase de equilibrio esta tendencia se pierde, por lo que se podría inferir que la velocidad con la que el INR se modifica posterior a un ajuste de dosis es superior en los pacientes con la variante AA, por lo cual estos pacientes podrían requerir consultas de re-evaluación con periodos de tiempo más reducidos.

Respecto a las interacciones farmacológicas, el 73% de los pacientes incluidos en el estudio se encontraban en polifarmacia; debido a la presencia de comorbilidades tales como hipertensión, diabetes, dislipidemias, hipotiroidismo e insuficiencia renal que requieren de una mayor prescripción de medicamentos se detectaron 46 interacciones con el medicamento anticoagulante, la mayoría con una severidad moderada (68%). Otros autores como Mohamed y cols., que incluyó a 340 pacientes en un estudio prospectivo, determinó la presencia de un total de 58 interacciones con el medicamento anticoagulante. A manera de contraste, dada la gran prevalencia de enfermedades cardiovasculares y endócrinas en territorio mexicano, se ha catalogado a México como un país con altos niveles de prescripción de medicamentos y práctica común de la polifarmacia (68), lo que explicaría la alta incidencia de interacciones en la población de estudio, los que representa una problemática no solo para el medicamento anticoagulante si no, de manera general para el uso de medicamentos.

Las interacciones farmacocinéticas, tal como lo menciona Wittkowsky (69), se asocian mayoritariamente a los medicamentos que interfieren con el metabolismo hepático. Dado que la población de estudio presentó diferentes afecciones cardíacas y las comorbilidades más frecuentes fueron diabetes, hipertensión, dislipidemias, hipotiroidismo e insuficiencia renal, los medicamentos en concomitancia asociados a estos efectos fueron la amiodarona, alopurinol y la glibenclamida. Destaca la amiodarona debido a su alta tasa de prescripción en población con afecciones cardíacas cuyo efecto como inhibidor enzimático a nivel hepático ya se ha reportado

en estudios previos (3). El estudio retrospectivo de Holm y cols., efectuado a 754 pacientes suecos que iniciaban tratamiento con amiodarona reportó que en el 37% de los pacientes tuvieron un incremento del INR observando valores mayores 3, por lo cual se requirió disminuir la dosis del medicamento anticoagulante un 25% para mantenerlos dentro del intervalo terapéutico respecto a los valores del INR.

A nivel farmacodinámico, Wells y cols. (26), mencionan que los mecanismos de interacción se encuentran principalmente asociados a interferencias con los factores de coagulación y medicamentos como levotiroxina (medicamento prescrito con alta frecuencia en la población estudiada), induce el metabolismo y degradación de estos factores. El estudio realizado por Wood y cols., indica que no existe implicación clínica de esta interacción al no observarse diferencias significativas en el INR y la dosis de mantenimiento en los pacientes antes y después de iniciar su tratamiento con levotiroxina (n= 102, p=0.068) (70).

Por otro lado, diuréticos como la clortalidona y espironolactona se encuentran mayoritariamente asociados a la hemoconcentración de los factores de coagulación, lo que provoca un incremento de la capacidad de coagulación de la sangre reduciendo el efecto terapéutico del medicamento anticoagulante. Sin embargo, el estudio reportado por Edwards y cols. (71), indica que dicha interacción no mostró relevancia clínica tras analizar retrospectivamente 123 pacientes que iniciaban su tratamiento con diuréticos en concomitancia con el medicamento anticoagulante. En dicho estudio no lograron registrar diferencias significativas en el INR antes y después de iniciar tratamiento con diuréticos (p= 0.09), observándose una variación media de 0.17 unidades en los valores del INR sin relevancia clínica en los pacientes estudiados.

Si bien se ha reportado el efecto de dichas interacciones por separado, a nivel clínico los pacientes suelen presentar dentro de un mismo esquema de medicación múltiples interacciones. Esto da origen a sinergismos o antagonismos, lo que complica predecir el efecto final observado. Gómez y cols., al evaluar el efecto de la polifarmacia y la

respuesta terapéutica a el medicamento anticoagulante a partir del número de medicamentos prescritos, reportaron que los pacientes con 3 o más medicamentos prescritos presentaron tiempos en rango terapéutico inferiores al 65%, lo cual es un indicativo de que la polifarmacia está claramente asociada al fallo terapéutico (5).

Respecto a la ingesta dietética de vitamina K, Zuchinali y cols. (24), indican que el consumo recomendado para una persona en tratamiento con anticoagulantes deberá ser menor a 90 µg/día en el caso de mujeres y 120 µg/día para hombres. En ninguno de los pacientes incluidos en el estudio fue necesario realizar modificaciones en su forma de alimentación ya que su ingesta resultó dentro de los valores deseables, situación que se explica debido a que 100% de los pacientes mencionó haber recibido asesoría nutricional por parte de su institución de salud pública y tenían nociones básicas de qué alimentos evitar.

Durante la aplicación del cuestionario se observó una tendencia en el consumo de alimentos como la avena, el frijol y el huevo, cuyo aporte de vitamina K es relativamente bajo. Dichos alimentos se asocian directamente a la dieta mexicana por lo que, en la población de estudio los alimentos ricos en vitamina K no figuran dentro de la lista de los alimentos más consumidos en territorio mexicano según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (72). Es importante considerar esta información al valorar el efecto de esta covariable sobre los valores de INR en la población estudiada.

Finalmente, se procedió a realizar la comparación de los modelos de regresión obtenidos en el presente estudio con los previamente reportados en la bibliografía (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de modelos de regresión con los reportados en la bibliografía.

| Autor (País, año) | “Tamaño de muestra” | Variable dependiente | Covariables | Asociación del intercepto (bx) | Eta ² (%) | Variabilidad explicada |
|--|---------------------|---|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------|
| MODELOS REPORTADOS EN LA BIBLIOGRAFIA | | | | | | |
| Hillman cols. (EUA, 2004) | 453 | Dosis el medicamento anticoagulante (mg/día) | CYP2C9 variante 3* | - | NR | 33.7% |
| | | | Edad | - | | |
| | | | Superficie corporal | + | | |
| | | | Superficie corporal ² | - | | |
| | | | Reemplazo valvular | + | | |
| | | | Diabetes | - | | |
| | | | Edad x Diabetes | - | | |
| Herman y cols. (Slovenia, 2005) | 59 | Ln (Dosis el medicamento anticoagulante) (mg/día) | CYP2C9 variante 1/2* o 1/3* | - | 11.0 | 37% |
| | | | CYP2C9 variante 2/2*, 2/3* o 3*/3* | - | 16.0 | |
| | | | Edad | - | 7.0 | |
| | | | Inductores del metabolismo | + | 2.0 | |
| | | | Peso magro | + | 1.0 | |
| Lenzini y cols. (EUA, 2008) | 1005 | Ln (Dosis el medicamento anticoagulante) (mg/día) | VKORC1 1639 (Ausente/ Presente) | - | 25.0 | 53.1% |
| | | | Superficie corporal | + | 9.0 | |
| | | | CYP2C9 variante 3* | - | 6.0 | |
| | | | Edad (por década) | - | 5.0 | |
| | | | CYP2C9 variante 2* | - | 5.0 | |
| | | | INR objetivo | + | 1.0 | |
| | | | Amiodarona | - | 1.0 | |
| | | | Fumador | + | 0.4 | |
| | | | Raza africana-americana | - | 0.4 | |
| | | | Tromboembolismo venoso | + | 0.3 | |
| Isaza y cols. (Colombia, 2010) | 145 | Dosis el medicamento anticoagulante (mg/día) | Edad | - | 2.5 | 47.4% |
| | | | Inhibidores del metabolismo | - | 8.7 | |
| | | | Inductores del metabolismo | + | 4.5 | |
| | | | CYP2C9 2* | - | 3.3 | |
| | | | CYP2C9 3* | - | 5.6 | |
| | | | VKORC1 1639 (GG, GA, AA) | - | 22.8 | |

| | | | | | | |
|--|-----|--|--|----|----------------|--------------|
| Cavallari y cols. (USA, 2011) | 50 | Ln (Dosis el medicamento anticoagulante) (mg/día) | VKORC1 1639 (GG, GA, AA) | - | 30.3 | 55% |
| | | | CYP2C9 2* o 3* | - | 8.2 | |
| | | | Edad | - | 8.2 | |
| | | | Superficie corporal | + | 3.7 | |
| | | | Tromboembolismo venoso | + | 4.5 | |
| Gemmati y cols. (Japón, 2016) | 133 | INR | Cp de warfarina (µg/mL) | NR | p=0.142 | NR |
| | | | Cp de 3-OH warfarina (µg/mL) | | p=0.002 | |
| | | | Dosis semanal (mg/semana) | | p=0.076 | |
| | | | CYP2C9 | | p=0.317 | |
| | | | VKORC1 | | p=0.866 | |
| MODELOS DESARROLLADOS EN EL ESTUDIO | | | | | | |
| Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Visita 1" | 22 | INR | Dosis del medicamento anticoagulante (mg/semana) | - | 0.1 | 58.4% |
| | | | Cp del medicamento anticoagulante (µg/mL) | + | 7.0 | |
| | | | VKORC1 1639 (GG, GA, AA) | + | 51.3 | |
| Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Visita 2" | 22 | INR | Índice de comorbilidad de Charlson | + | 9.7 | 70.6% |
| | | | Cp del medicamento anticoagulante (µg/mL) | + | 41.6 | |
| | | | Cp de metabolito hidroxilado (µg/mL) | + | 19.3 | |
| Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Deltas" | 22 | Δ INR | Índice de comorbilidad de Charlson | + | 1.4 | 37.2% |
| | | | Δ Dosis del medicamento anticoagulante (mg/semana) | + | 17.9 | |
| | | | Δ Cp del medicamento anticoagulante (µg/mL) | + | 17.9 | |

Como se puede observar en la Tabla 5, la mayoría de los modelos reportados emplean como variable dependiente a la dosis del medicamento anticoagulante tanto en su forma simple como transformada a logaritmo natural, siendo únicamente el modelo de Gemmati y cols. el que analiza como variable dependiente al INR. Es evidente la falta de estudios y la construcción de modelos que evalúen la variabilidad del INR, en los que se realiza un abordaje desde el punto de vista farmacodinámico y no posológico.

De los modelos analizados, destaca la inclusión de covariables tales como la superficie corporal y el peso magro, covariables que no fueron incluidas durante el desarrollo de los presentes modelos. Sin embargo, en los modelos propuestos por Lenzini y cols., así como el de Cavallari y cols., los cuales incorporan la superficie corporal como covariable, reportan valores de Eta^2 muy bajos, 0.09 y 0.037 respectivamente, lo que significa que dicho parámetro no es determinante en la variabilidad de la dosis.

En el modelo desarrollado por Herman y cols., la inclusión de la composición corporal se realizó en forma del peso magro y reportó valores de Eta^2 de 0.01. Al respecto Xue y cols., señalan que la composición corporal no influye en el volumen de distribución y aclaramiento del medicamento anticoagulante debido a que su distribución está limitada únicamente al compartimento central (sangre), dada su alta unión a proteínas y baja liposolubilidad (22). En la presente investigación no se incluyó esta covariable, sin embargo, una perspectiva interesante del estudio sería evaluar esta tendencia cuando la variable dependiente es el INR.

Respecto al abordaje de las interacciones farmacológicas los únicos modelos que incluyen esta covariable dentro de su análisis son los reportados Herman y cols., Isaza y cols. y Lenzini y cols. La inclusión de la covariable se realizó como ausencia o presencia de medicamentos que induzcan o inhiban el metabolismo del medicamento anticoagulante, por lo que dichos autores sólo evaluaron las interacciones de tipo farmacocinético. Para el modelo Lenzini y cols., se observa que la adición de esta covariable solo se realiza respecto a la ausencia o presencia de amiodarona por lo que el abordaje de las interacciones en estos modelos es limitado. En el modelo de Isaza y cols., se observa la influencia de las interacciones en la variabilidad de la dosis con

Eta² de 0.08 y 0.04 para los inductores e inhibidores del CYP2C9, respectivamente. A diferencia de los modelos previamente reportados, los modelos desarrollados en el presente estudio incluyeron a las interacciones como una covariable continua. Pese a esta diferencia, no se logró observar significancia estadística, sin embargo, su efecto sobre la variabilidad del INR no se puede descartar completamente dado el tamaño de muestra.

La totalidad de los modelos incluyen como covariables al CYP2C9 y VKORC1 1639. El polimorfismo CYP2C9 fue incluido como ausencia o presencia de las variantes 2* y 3* las cuales están asociadas a un fenotipo de metabolizador lento, mientras que el polimorfismo VKORC1 1639 se incluyó estratificado en las tres variantes polimórficas (GG, GA y AA), aspecto que se consideró en el presente estudio.

Se observa que para todos los modelos, dichas covariables presentan los mayores valores de Eta², atribuyéndoles el mayor porcentaje de la variabilidad explicada para la dosis del medicamento anticoagulante. Esta situación no se refleja en el modelo de Gemmati y cols., y en los modelos propuestos del presente estudio debido a que la variable dependiente es el INR.

Como se mencionó previamente el polimorfismo CYP2C9 no fue incluido en este estudio dada su baja prevalencia en la población estudiada, contrario a lo que sucedió con el polimorfismo VKORC1 1639, el cual resultó ser significativo con los datos recopilados de la visita 1. Dicha covariable dejó de ser significativa con los datos de la visita 2 posterior al ajuste de dosis efectuado en los pacientes. Tal como señala Li y cols., una vez determinado en cual rango de dosis ubicar al paciente, éste deja de tener influencia sobre los valores del INR, razón por la cual su detección está recomendada al inicio del tratamiento(20,66).

Respecto a la factores clínicos y comorbilidades todos los modelos los incluyen pero abordados de diferente manera. El modelo de Hillman y cols., incluye covariables como la edad y a la ausencia o presencia de diabetes y considera si los pacientes tienen remplazo valvular. En lo que respecta a los modelos de Lenzini y cols. y Cavallari y

cols., se hace especial énfasis al tromboembolismo venoso. De manera general, se observa que el abordaje de los factores clínicos y comorbilidades en dichos modelos es muy limitado u orientado a patologías muy específicas, lo cual puede contribuir al ajuste final del modelo dado que sus valores de Eta^2 son 0.04 y 0.003, respectivamente. En comparación a los modelos desarrollados en el presente estudio, las comorbilidades y la edad se integraron en un sólo parámetro, el ICH, covariable que demostró tener una influencia positiva y significativa sobre los valores de INR, lo que indica que a mayor edad y comorbilidades se espera un incremento de los valores del INR ($Eta^2=0.097$).

Por otro lado, la ingesta dietética de vitamina K no es incluida en ninguno de los modelos recuperados en la bibliografía. Pese a la gran evidencia reportada sobre la influencia de una dieta rica en vitamina K y la terapia anticoagulante (24,47,73) pocos estudios han realizado su abordaje de manera conjunta con otros factores. En la presente investigación, la ingesta dietética de vitamina K expresada en $\mu\text{g}/\text{día}$ fue incluida durante la construcción de los modelos de regresión múltiple, sin embargo ésta no mostró significancia estadística.

Una de las principales diferencias respecto a los modelos reportados es la inclusión de las concentraciones plasmáticas como covariables. De los 6 modelos analizados el único que incluye concentraciones plasmáticas como covariables es el reportado por Gemmati y cols. En dicho estudio se indica que el metabolito hidroxilado en la posición 3 (metabolito activo), es el único que posee significancia estadística en el análisis de regresión multivariado respecto a los valores de INR. Comparado al modelo construido en la presente investigación se encontró que las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante, el metabolito hidroxilado y el índice de comorbilidad de Charlson logran explicar hasta el 70% de la variabilidad del INR, datos que en el modelo de Gemmati no se reportan.

Dado que 5 de los 6 modelos analizados incluyen como variable dependiente la dosis del medicamento anticoagulante, no fue posible realizar un comparación directa del grado de variabilidad explicada reportado en cada modelo, sin embargo se denota que

el modelo de Lenzini y cols, así como el de Cavallari y cols., fueron los que mayor porcentaje de variabilidad explicada de 53% y 55%, respectivamente.

En resumen:

- Se estandarizó un método analítico por HPLC/UV-Vis para la cuantificación simultánea del medicamento anticoagulante y su metabolito hidroxilado en plasma conforme a la NOM-177-SSA1-2013. El método fue lineal y demostró ser preciso y exacto en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Se demostró la estabilidad de las muestras en condiciones de almacenamiento de -80°C por 120 días y 3 ciclos congelación – descongelación. El método fue útil para determinar las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y metabolito hidroxilado de los pacientes incluidos en el estudio.
- Se identificó la presencia del polimorfismo VKORC1 (1639), obteniendo frecuencias genotípicas similares a las descritas en la literatura y se determinó que la población de estudio cumple con el equilibrio de Hardy Weinberg.
- Se evaluó el esquema de medicación de los pacientes incluidos en el estudio identificando que el 73% de los pacientes se encontraba en polifarmacia. La tercera parte de las interacciones detectadas en los pacientes incluidos en el estudio fueron con el medicamento anticoagulante observando alta frecuencia de aquéllas que producen una potenciación del efecto anticoagulante.
- Se evaluó la ingesta dietética de vitamina K de los pacientes incluidos en el estudio obteniendo valores dentro de los límites recomendados, esto debido a que los pacientes recibieron asesoría nutricional previo a la inclusión en el estudio.

9. Conclusiones

En el presente estudio se abordó la variabilidad de la respuesta a el medicamento anticoagulante desde el punto de vista farmacodinámico. El modelo de regresión propuesto logra explicar hasta el 70% de la variabilidad del INR empleando como covariables el ICH, que incluye factores como la edad y las comorbilidades, así como las concentraciones plasmáticas del medicamento anticoagulante y las concentraciones plasmáticas del metabolito hidroxilado, por lo que podrían ser considerados como los mejores predictores de la respuesta terapéutica a el medicamento anticoagulante.

La construcción de diferentes modelos explicativos sienta las bases para la construcción de un futuro modelo predictivo. La inclusión de más pacientes permitirá desarrollar un modelo más robusto, cuya utilidad sea predecir un determinado valor de INR a partir de los datos obtenidos en el paciente para ubicarlo de manera rápida y sencilla dentro de rango terapéutico.

10. Referencias bibliográficas

1. INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2021. 2021;1–45.
2. Yurgaky J, Rodríguez F. El medicamento anticoagulante: uso contemporáneo Warfarin: current use. 2009.
3. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2010 May;87(5):572–8.
4. González FL, González Silva NE, Ortelli Tomada GM, Sancassani PE, Mathieu ME. Valoración del tiempo en rango terapéutico en pacientes bajo tratamiento con antagonistas orales de la vitamina K en un centro de anticoagulación | *Revista Hematología* [Internet]. *HEMATOLOGÍA*, Volumen 24. 2020 [cited 2022 Jul 25]. p. 32–9. Available from: <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/262>
5. Gómez Andreina, Peixoto Stephania, Azcúnaga María, Gama Alejandra, Lluberas Natalia, Álvarez Pablo. Tiempo en rango terapeutico. *Revista de Uruguay de Cardiología*. 2014;29(3):311–6.
6. Kaski JC, Arrebola-Moreno AL. Inflammation and thrombosis in atrial fibrillation. *Revista Espanola de Cardiologia*. 2011;64(7):551–3.
7. Lara-vaca S, Cordero-cabra A. Registro Mexicano de Fibrilación Auricular (ReMeFa). *Registro Mexicano de Fibrilación Auricular (ReMeFa)*. 2014;150(1):48–59.
8. Ramírez-Barrera JD, Agudelo-Uribe JF, Correa-Velásquez R, González-Rivera E. Fisiopatología de la fibrilación auricular. *Revista Colombiana de Cardiologia*. 2016 Dec 1;23:9–14.
9. Rodrigo-López JL. Válvulas cardíacas: funcionamiento y enfermedades. *Libro de Salud Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos* [Internet]. 2009;457–62. Available from: https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap51.pdf
10. Martínez Monzonís A, Vega Fernández JM, Abu Assi E, Raposeiras Roubín S. Valvulopatías. *Medicine (Spain)*. 2013;11(41):2441–3.
11. López M R. FIBRILACIÓN AURICULAR. *Revista Medica de Costa y Centroamerica*. 2016;(619):273–7.

12. Rodríguez-Reyes H, Arauz-Góngora A, Asensio-Lafuente E, Celaya-Cota M de J, Cordero-Cabra A, Guevara-Valdivia M, et al. Reunión multidisciplinaria sobre el uso de los anticoagulantes orales directos en la fibrilación auricular no valvular. *Archivos de Cardiología de México*. 2017;87(2):124–43.
13. Bhardwaj P, Petersen LB, Binko TS, Petersen JR, Fornitz GG. Slightly elevated international normalized ratio predicts bleeding episodes in patients treated with direct oral anticoagulants. *Journal of International Medical Research*. 2020 Jun 1;48(6).
14. Quintero Gonzales JA. Cincuenta años de uso clínico de warfarina. Vol. 51, *Invest Clin*. 2010.
15. Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1974;15(4):424–30.
16. Holford NHG. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin: Understanding the Dose-Effect Relationship. *Clinical Pharmacokinetics*. 1986;11(6):483–504.
17. Gemmati D, Burini F, Talarico A, Fabbri M, Bertocco C, Vigliano M, et al. The active metabolite of warfarin (3'-hydroxywarfarin) and correlation with INR, warfarin and drug weekly dosage in patients under oral anticoagulant therapy: A pharmacogenetics study. *PLoS ONE*. 2016;11(9):1–16.
18. Steinberg BA, Daubert JP. Dose-Adjusted warfarin: Writing the prescription is only the beginning. Vol. 46, *Journal of Electrocardiology*. 2013. p. 51–3.
19. Li X, Li D, Wu JC, Liu ZQ, Zhou HH, Yin JY. Precision dosing of warfarin: open questions and strategies. *Pharmacogenomics Journal*. 2019;19(3):219–29.
20. Homero GE. Polifarmacia y morbilidad en adultos mayores. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(1):31–5.
21. Xue L, Holford N, Ding XL, Shen ZY, Huang CR, Zhang H, et al. Theory-based pharmacokinetics and pharmacodynamics of S- and R-warfarin and effects on international normalized ratio: influence of body size, composition and genotype in cardiac surgery patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2017;83(4):823–35.
22. Tan CSS, Lee SWH. Warfarin and food, herbal or dietary supplement interactions: A systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;87(2):352–74.

23. Zuchinali P, Souza GC, Assis MCS de, Rabelo ER, Rohde LE. Dietary vitamin K intake and stability of anticoagulation with coumarins ; evidence derived from a clinical trial. 2012;27(6):1987–92.
24. Kawai M, Harada M, Motoike Y, Koshikawa M, Ichikawa T, Watanabe E, et al. Impact of serum albumin levels on suprathreshold PT-INR control and bleeding risk in atrial fibrillation patients on warfarin: A prospective cohort study. *IJC Heart and Vasculature*. 2019;22:111–6.
25. Wells PS, Frpc C, Holbrook AM, Frpc C, Crowther NR, Hirsh J, et al. Interactions of Warfarin with Drugs and Food. 1994;(C).
26. Villegas-torres B, Sánchez-girón F, Jaramillo-villafuerte K, Soberón X, Gonzalez-covarrubias V. Genotype frequencies of VKORC1 and CYP2C9 in Native and Mestizo populations from Mexico , potential impact for coumarin dosing. *Gene* [Internet]. 2015;558(2):235–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.068>
27. Weathermon R, Pharm D, Crabb DW. Alcohol and Medication Interactions. *Alcohol Research & Health*. 1999;23.
28. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Spectroscopic techniques in the study of protein binding . A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol. 1975;129–40.
29. Charles C eun H, David EP, Krishna SP, Bhagavan N v. Investigations of the Effects of Ethanol on Warfarin Binding to Human Serum Albumin. 2000;96822:114–21.
30. Téllez-ávila FI, Chávez-tapia NC, Torre-delgadillo A. Trastornos de coagulación en el cirrótico. 2007;153–60.
31. Isaza C, Beltrán L, Henao J, Porras G, Pinzón A. Factores genéticos y ambientales asociados con la respuesta a el medicamento anticoagulante en pacientes colombianos. 2010;
32. Guia practica clinica anticoagulación. 2009;
33. Parrondo CD, Moreno CR, Tato Herrero F, Alonso Vence N, Lado FLL, Anticoagulation O. Anticoagulación oral. Vol. 20, AN. MED. INTERNA (Madrid). 2003.
34. López Santiago N. Pruebas de coagulación. *Acta Pediátrica Mexicana*. 2016;37(4):241–5.

35. Carrasco E M. Diabetología inicio , ajuste y precauciones en su utilización Oral anticoagulant treatment : initiation , adjustment and use precautions. *Avances en Diabetología*. 2010;26:17–20.
36. Blasdale C, Lawrence CM. Perioperative international normalized ratio level is a poor predictor of postoperative bleeding complications in dermatological surgery patients taking warfarin. *British Journal of Dermatology*. 2008;158(3):522–6.
37. Rahmatini R, Aliska G, Usman E, Yanni M, Ilmiawati C. Plasma warfarin level and international normalized ratio do not correlate with bleeding events in indonesian patients of minangkabau ethnicity with atrial fibrillation. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020 Apr 27;8(B):192–7.
38. Sun S, Wang M, Su L, Li J, Li H, Gu D. Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;42(2):218–22.
39. Kulkarni UP, Swar BD, Karnad DR, Davis S, Patwardhan AM, Kshirsagar NA, et al. A pilot study of the association of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of warfarin with the dose in patients on long-term anticoagulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;65(5):787–90.
40. Locatelli I, Kmetec V, Mrhar A, Grabnar I. Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005;818(2):191–8.
41. Miura M, Okuyama S, Kato S, Kagaya H. Simultaneous Determination of Warfarin and 7-Hydroxywarfarin Enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. 2011;108–14.
42. Cotización Servicios de Lab y Cursos - IPN [Internet]. [cited 2022 Aug 8]. Available from: <https://www.ipn.mx/nanocentro/transferecia/cotizacion.html>
43. Castelhanos Rojas R, Ferrer Herrera IM, Segura Pujal LA, Manuel Ojeda Matías LR, Maria Alfonso Hernández LC. Resistencia y sensibilidad a el medicamento anticoagulante Resistance and sensibility to warfarin. 2014.
44. Dias Mendonça D, Zuchinali P, Souza GC. Development of a food frequency questionnaire to determine vitamin k intake in anticoagulated patients: A pilot study. *Revista Chilena de Nutricion*. 2018;45(4):363–71.
45. Li RC, Finkelman BS, Chen J, Booth SL, Bershaw L, Brensinger C, et al. Dietary vitamin K intake and anticoagulation control during the initiation phase of warfarin therapy: A prospective cohort study Dear Sirs. 2013 [cited 2022 Aug 8]; Available from: www.thrombosis-online.com

46. Couris RR, Tataronis GR, Booth SL, Dallal GE, Blumberg JB, Dwyer JT. Development of a self-assessment instrument to determine daily intake and variability of dietary vitamin K. *J Am Coll Nutr.* 2000;19(6):801–7.
47. Shatenstein B, Nadon S, Godin C, Ferland G. Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire. <https://doi.org/10.3148/662200567> [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 8];66(2):67–75. Available from: <https://dcjournal.ca/doi/10.3148/66.2.2005.67>
48. Couris R, Tataronis G, McCloskey W, Oertel L, Dallal G, Dwyer J, et al. Dietary vitamin K variability affects International Normalized Ratio (INR) coagulation indices. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 2006 Mar;76(2):65–74.
49. Castelán-Martínez OD, Hoyo-Vadillo C, Sandoval-García E, Sandoval-Ramírez L, González-Ibarra M, Solano-Solano G, et al. Allele frequency distribution of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms in six Mexican populations. *Gene.* 2013 Jul 10;523(2):167–72.
50. Villegas-Torres B, Sánchez-Girón F, Jaramillo-Villafuerte K, Soberón X, Gonzalez-Covarrubias V. Genotype frequencies of VKORC1 and CYP2C9 in Native and Mestizo populations from Mexico, potential impact for coumarin dosing. *Gene.* 2015 Mar 10;558(2):235–40.
51. Johnson JA, Cavallari LH. Warfarin pharmacogenetics. Vol. 25, *Trends in Cardiovascular Medicine.* Elsevier Inc.; 2015. p. 33–41.
52. Índice de Comorbilidad de Charlson (CCI) | SAMIUC [Internet]. 2022 [cited 2022 Aug 6]. Available from: <https://www.samiuc.es/indice-de-comorbilidad-de-charlson-cci/>
53. Drug Interactions search - MICROMEDEX [Internet]. [cited 2022 Jul 31]. Available from: https://www.micromedexsolutions.com.creativaplus.uaslp.mx/micromedex2/librarian/CS/461A95/ND_PR/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONS/HIELDSYNC/ACE430/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.FindDrugInteractions?navitem=topInteractions&isToolPage=true
54. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS. [Internet]. CRC PRESS; 2020 [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.routledge.com/High-Performance-Liquid-Chromatography-in-Pesticide-Residue-Analysis/Tuzimski-Sherma/p/book/9780367575724>

55. Kumar DK, Shewade DG, Parasuraman S, Rajan S, Balachander J, Chandran BVS, et al. Estimation of plasma levels of warfarin and 7-hydroxy warfarin by high performance liquid chromatography in patients receiving warfarin therapy. *Journal of Young Pharmacists*. 2013;5(1):13–7.
56. Osman A, Arbring K, Lindahl TL. A new high-performance liquid chromatographic method for determination of warfarin enantiomers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005;826(1–2):75–80.
57. Ring PR, Bostick JM. Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000;22(3):573–81.
58. Diario Oficial de la Federación. NOM-177-SSA1-2013 Bioequivalencia y Biocomparabilidad. In 2013.
59. Aluru JS, Barsouk A, Saginala K, Rawla P, Barsouk A. Valvular Heart Disease Epidemiology. *Medical Sciences*. 2022 Jun 15;10(2):32.
60. Tajer C, Ceresetto J, Bottaro F, Martí A, Casey M. Evaluación del tiempo en rango terapéutico en pacientes con fibrilación auricular tratados crónicamente con antagonistas de la vitamina K por especialistas en hemostasia de la Argentina. *Registro TERRA (Tiempo En Rango en la República Argentina). Hematología*. 2016;20(1):9–26.
61. Garrison SR, Green L, Kolber MR, Korownyk CS, Olivier NM, Heran BS, et al. The Effect of Warfarin Administration Time on Anticoagulation Stability (INRange): A Pragmatic Randomized Controlled Trial. *Annals of Family Medicine [Internet]*. 2020 Jan 1 [cited 2022 Aug 2];18(1):42. Available from: /pmc/articles/PMC7227461/
62. Kulkarni UP, Swar BD, Karnad DR, Davis S, Patwardhan AM, Kshirsagar NA, et al. A pilot study of the association of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of warfarin with the dose in patients on long-term anticoagulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008 May;65(5):787–90.
63. Lombardi R, Chantarangkul V, Cattaneo M, Tripodi A. Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio. *Thrombosis Research*. 2003;111(4–5):281–4.
64. Zuo Z, Wo SK, Lo CMY, Zhou L, Cheng G, You JHS. Simultaneous measurement of S-warfarin, R-warfarin, S-7-hydroxywarfarin and R-7-hydroxywarfarin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010 Jun;52(2):305–10.

65. Cavallari LH, Momary KM, Patel SR, Shapiro NL, Nutescu E, Viana MAG. Pharmacogenomics of Warfarin dose requirements in Hispanics. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2011 Feb 15;46(2):147–50.
66. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Michael Stein C, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2009;113(17):3925–30.
67. Ye C, Jin H, Zhang R, Sun Y, Wang Z, Sun W, et al. Variability of warfarin dose response associated with CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms in Chinese patients.
68. Jokanovic N, Tan ECK, Dooley MJ, Kirkpatrick CM, Bell JS. Prevalence and Factors Associated With Polypharmacy in Long-Term Care Facilities: A Systematic Review. *J Am Med Dir Assoc*. 2015 Jun 1;16(6):535.e1-535.e12.
69. Wittkowsky AK. Warfarin and Other Coumarin Derivatives: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Drug Interactions. *Seminars in Vascular Medicine*. 2003;3(3):221–30.
70. Wood MD, Delate T, Clark M, Clark N, Horn JR, Witt DM. An evaluation of the potential drug interaction between warfarin and levothyroxine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(8):1313–9.
71. Edwards HD, Webb RD, Conway SE. Effect of oral diuretics on chronic warfarin therapy: A retrospective study. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2012 May;11(3):375–80.
72. Jasso IM, Becerra PAV. LA ALIMENTACIÓN EN MÉXICO A Marco conceptual sobre alimentación y nutrición. 2005.
73. Lurie Y, Loebstein R, Kurnik D, Almog S, Halkin H. Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010 Aug;70(2):164–70.

11. Glosario

Accidente cerebrovascular: Bloqueo del flujo sanguíneo que irriga al tejido cerebral impidiendo su oxigenación y suministro de nutrientes (12).

Aclaramiento: velocidad con la que un fármaco es eliminado de forma irreversible de la circulación sistémica (16).

Anticoagulante: Sustancia que reduce la capacidad coagulativa de la sangre previniendo la formación de trombos (34).

Antagonista: Compuesto que se une al receptor y no posee la capacidad activar la vía de señalización correspondiente (2).

Biodisponibilidad: fracción de la dosis administrada que logra alcanzar la circulación sistémica (16).

Blanco de matriz biológica: muestra de matriz biológica a la cual no se le ha añadido analitos (59).

Comorbilidad: Término empleado para describir que dos o más trastornos ocurren en el mismo individuo (21).

Cromatografía de líquidos: Método de separación de compuestos en función de su polaridad donde la fase estacionaria se compone de un material sólido y la fase móvil de un líquido (57).

Curva de calibración: relación de la respuesta obtenida por parte del instrumento y las concentraciones de los estándares (59).

Efecto acarreo: aumento en la señal del analito en consecuencia del análisis de una muestra anterior (59).

Efecto matriz: interferencias debido a la presencia de analitos presentes en la matriz biológica (59).

Estabilidad: parámetro que mide la integridad de un analito en una matriz en condiciones específicas de almacenamiento (59).

Estabilidad en ciclos congelación – descongelación: se refiere a la estabilidad de los analitos en la muestra al congelarse y descongelarse (59).

Estándar de referencia: sustancia química de pureza e identidad conocida, utilizada para la preparación de estándares y muestras control (59).

Exactitud: grado de proximidad del valor determinado con respecto al valor nominal.

Fibrilación: Ritmo cardíaco irregular y rápido derivado de una contracción irregular de las fibras musculares cardíacas (74).

Interferencia: acción de los componentes de la matriz biológica que pueden afectar la cuantificación del analito de interés (59).

Índice normalizado internacional: Forma estandarizada del tiempo de protrombina que refleja el tiempo que tarda en coagularse la sangre (34).

Interacciones medicamentosas: Reacción entre dos o más medicamentos modificando la magnitud y duración del efecto o generando una respuesta distinta a la esperada (75).

Precisión: grado de concordancia entre una serie de mediciones (59).

Pretratamiento: procesamiento de una muestra que se ha sometido a diferentes manipulaciones (extracción, dilución, etc.) (59).

Polimorfismo genético: Variaciones naturales de la secuencia de un gen que se expresa en por lo menos el 1% de la población (76).

Selectividad: parámetro en que un método puede determinar un compuesto de interés en las matrices seleccionadas sin que exista interferencia por parte de los componentes de la matriz (59).

Tiempo de protrombina: parámetro que evalúa el tiempo que tarda en coagularse la sangre (35).

Porcentaje de tiempo en rango terapéutico: porcentaje del tiempo que el paciente se encontraba dentro del intervalo de 2 a 3 respecto al INR (5).

Trombosis: Formación de un coagulo de sangre dentro de circulación sistémica que interrumpe el flujo normal de la sangre (9).

Unión a proteínas: porcentaje de interacción de las proteínas en el organismo con los fármacos administrados (25).

Valvulopatía: enfermedades que afectan el correcto funcionamiento de las válvulas cardiacas impidiendo su correcto cierre o apertura interfiriendo con el correcto flujo de la sangre a través de las cavidades cardíacas (10).

Vida media: tiempo en que un fármaco se reduce un 50% en el organismo (16).

Volumen de distribución: Parámetro que relaciona la concentración de un fármaco en el plasma con la cantidad total del fármaco en el organismo (16).