



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 warfarina 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 de warfarina 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

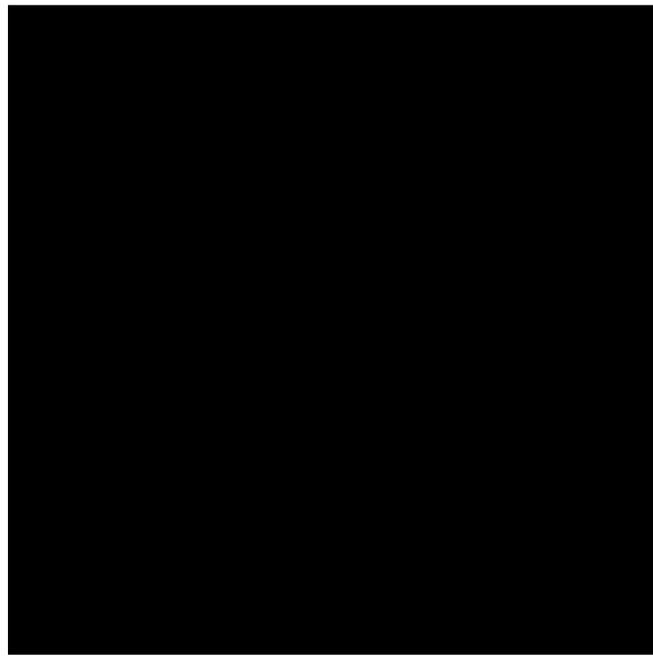
Rodríguez Pérez Omar-Tesis 220822.pdf
INFORME DE ORIGINALIDAD
<b>14%</b>
ÍNDICE DE SIMILITUD

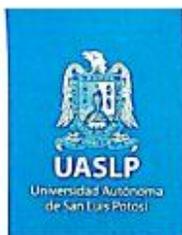
## INTEGRANTES DEL JURADO:

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**

U  
A  
S  
L  
P



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 warfarina, esta 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 22 pacientes (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 warfarina. 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 de warfarina y su metabolito.

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

## ABSTRACT

The international normalized ratio (INR), a biomarker used in warfarin 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 22 patients (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 warfarin. 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 warfarin and its metabolite as covariates.

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

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	2
<b>2.1 Fibrilación auricular</b> .....	2
<b>2.2 Enfermedades valvulares</b> .....	3
<b>2.3 Manejo clínico y terapéutico de las FA y las EV</b> .....	3
<b>2.4 Terapia anticoagulante</b> .....	5
<b>2.5 Warfarina</b> .....	5
<b>2.5.1 Farmacocinética de la warfarina</b> .....	7
<b>2.5.2 Variabilidad de la respuesta a warfarina</b> .....	7
<b>2.6 Monitorización de la terapia anticoagulante</b> .....	10
<b>2.6.1 Índice internacional normalizado (INR)</b> .....	12
<b>2.6.2 Monitorización terapéutica de warfarina</b> .....	13
<b>2.7 Métodos analíticos para la cuantificación de warfarina</b> .....	13
<b>2.8 Interacciones farmacológicas</b> .....	14
<b>2.9 Efecto de la dieta sobre la respuesta farmacológica</b> .....	17
<b>2.10 Farmacogenética de la warfarina</b> .....	18
<b>3. Justificación</b> .....	19
<b>4. Hipótesis</b> .....	20
<b>5. Objetivos</b> .....	20
<b>5.1 Objetivo general</b> .....	20
<b>5.2 Objetivos específicos</b> .....	20
<b>6. Metodología</b> .....	21

<b>6.1 Metodología de investigación farmacológica .....</b>	<b>21</b>
<b>6.1.1 Equipo y Reactivos .....</b>	<b>21</b>
<b>6.1.2 Estandarización del método analítico para la cuantificación de warfarina y 7-OH warfarina en muestras de plasma sanguíneo.....</b>	<b>22</b>
<b>6.1.2.1 Condiciones Cromatográficas .....</b>	<b>22</b>
<b>6.1.2.2 Estabilización del equipo .....</b>	<b>23</b>
<b>6.1.2.3 Preparación curva de calibración y controles de calidad.....</b>	<b>23</b>
<b>6.1.2.4 Método de extracción en muestras de plasma. ....</b>	<b>24</b>
<b>6.1.3 Validación del método analítico en plasma .....</b>	<b>25</b>
<b>6.1.3.1 Linealidad.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1.3.2 Precisión .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1.3.3 Exactitud .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1.3.4 Selectividad.....</b>	<b>27</b>
<b>6.3.6 Estabilidad de la muestra.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1.4 Genotipificación PCR tiempo real acoplado a sonda TaqMan™.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1.4.1 Extracción ADN genómico .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1.4.2 Reacción de amplificación .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1.4.3 Condiciones termociclador .....</b>	<b>29</b>
<b>6.2 Metodología investigación clínica .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2.1 Diseño del estudio .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2.2 Lugar de realización .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2.3 Universo de estudio .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2.4 Método de muestreo.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2.5 Tamaño de muestra.....</b>	<b>31</b>

6.2.6	Criterios de selección.....	31
6.2.7	Plan de trabajo .....	32
6.2.8	Análisis de muestras sanguíneas.....	33
6.2.9	Evaluación ingesta dietética de vitamina K .....	33
6.2.10	Detección de interacciones medicamentosas .....	33
6.2.11	Cuadro de variables.....	34
6.2.12	Análisis estadístico .....	36
6.2.13	Aspectos éticos .....	37
7.	Resultados.....	38
7.1	Estandarización del método analítico de cuantificación .....	38
7.1.1	Condiciones cromatográficas.....	38
7.1.2	Cromatograma en agua.....	39
7.1.4	Cromatograma en plasma.....	40
7.2	Validación de la técnica de bioanálisis .....	42
7.2.1	Linealidad en matriz biológica de plasma.....	42
7.2.2	Precisión y exactitud .....	44
7.2.4	Selectividad.....	45
7.2.5	Estabilidad de la muestra.....	45
7.3	Estudio clínico .....	49
7.3.1	Características demográficas y clínicas de la población .....	49
7.3.2	Concentraciones plasmáticas de warfarina y 7-OH warfarina.....	52
7.3.3	Genotipificación del polimorfismo VKORC1 .....	54
7.3.4	Detección de interacciones medicamentosas con warfarina .....	58
7.3.5	Determinación del consumo de vitamina K .....	59

7.3.7 Análisis de regresión multivariada.....	61
8. Discusión de resultados.....	66
10. Referencias bibliográficas.....	82
11. ANEXOS.....	89
ANEXO I. BARRIDOS UV .....	90
ANEXO II. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE AND .....	91
ANEXO III. INFOGRAFÍA RECLUTAMIENTO DE PACIENTES .....	92
ANEXO IV. CARTA APROBACIÓN DE ENMIENDA COMITÉ ESTATAL .....	93
ANEXO V. CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	94
ANEXO VI. HOJA RECOLECCIÓN DE DATOS .....	102
ANEXO VII. CARTAS DE APROBACION COMITES DE ÉTICA .....	104
ANEXO VIII. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO .....	109
ANEXO IX. GRÁFICOS DE AMPLIFICACIÓN ( $\Delta$ ARN VS CICLOS). .....	113
12. Glosario .....	116

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores involucrados en la variabilidad de la respuesta a warfarina .....	8
Tabla 2. Pruebas de coagulación.....	11
Tabla 3. Interacciones farmacológicas con warfarina .....	15
Tabla 4. Preparación curva de calibración y controles de calidad .....	24
Tabla 5. Componentes reacción de amplificación.....	29
Tabla 6. Programa de termociclado para reacción de amplificación.....	29
Tabla 7. Cuadro de operacionalización de variable .....	34
Tabla 8. Condiciones cromatográficas finales .....	38
Tabla 9. Curvas de calibración para warfarina y 7-OH warfarina .....	42
Tabla 10. Repetibilidad.....	44
Tabla 11. Reproducibilidad.....	45
Tabla 12. Estabilidad de la muestra.....	46
Tabla 13. Ciclos congelación descongelación.....	47
Tabla 14. Características demográficas basales de la población.....	50
Tabla 15. Comparación de variables clínicas.....	51
Tabla 16. Análisis descriptivo de las concentraciones plasmáticas y ratio metabólico.....	52
Tabla 17. Asociación entre las concentraciones plasmáticas y la dosis de mantenimiento.....	54
Tabla 18. Comparación de las frecuencias genotípicas.....	55
Tabla 19. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	56
Tabla 20. Efecto del polimorfismo VKORC1 (1639) sobre la dosis de mantenimiento.....	56
Tabla 21. Análisis descriptivo de interacciones medicamentosas con warfarina .....	58
Tabla 22. Análisis de regresión lineal univariada.....	60
Tabla 23. Análisis de regresión lineal multivariada .....	61
Tabla 25. Construcción de modelos saturados .....	62
Tabla 26. Modelo regresión lineal múltiple “Visita 1” .....	63
Tabla 27. Modelo regresión lineal múltiple “Visita 2” .....	64
Tabla 28. Modelo regresión lineal múltiple “Deltas” .....	65
Tabla 29. Comparación de modelos de regresión con los reportados en la bibliografía.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la warfarina .....	5
Figura 2. Los AVK y los inhibidores directos .....	6
Figura 3. Ecuación cálculo de resolución entre picos. ....	23
Figura 4. Extracción de warfarina y 7-OH warfarina a partir de plasma .....	25
Figura 5. Gráfico de temperaturas para reacción de amplificación.....	30
Figura 6. Cromatograma en agua que muestra la separación de warfarina, 7-OH warfarina y metronidazol (EI) en concentración de 10 µg/mL.....	39
Figura 7. Cromatograma en plasma que muestra la separación de warfarina, 7-OH warfarina (5 µg/mL) y metronidazol (EI) (2.5 µg/mL).....	40
Figura 8. Curvas de calibración en plasma para A)Warfarina y B) 7-OH warfarina .....	43
Figura 9. Flujograma de los pacientes que participaron en el estudio.....	49
Figura 10. Comparación de las concentraciones plasmáticas entre la visita 1 y 2. ....	53
Figura 11. Comparación del ratio metabólico entre la visita 1 y 2 .....	53
Figura 12. Gráficos de amplificación ( $\Delta R_n$ vs Ciclos).....	55
Figura 13. Efecto del polimorfismo VKORC1 1639 sobre la dosis de mantenimiento .....	57
Figura 14. Efecto del polimorfismo VKORC1 1639 sobre el INR .....	57
Figura 15. Aporte de vitamina K estratificado por grupos de alimentos .....	59
Figura 16. Análisis de correlación Spearman (Delta INR vs Delta dosis de warfarina).....	61

## 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 la warfarina se ubica como uno de los principales medicamentos que cumplen esta función (2). La optimización de la terapia farmacológica con warfarina 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 de warfarina 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 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 Warfarina.

Los AVK son medicamentos derivados de compuestos cumarínicos. Dentro de este grupo, se ubica principalmente a la warfarina, 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).

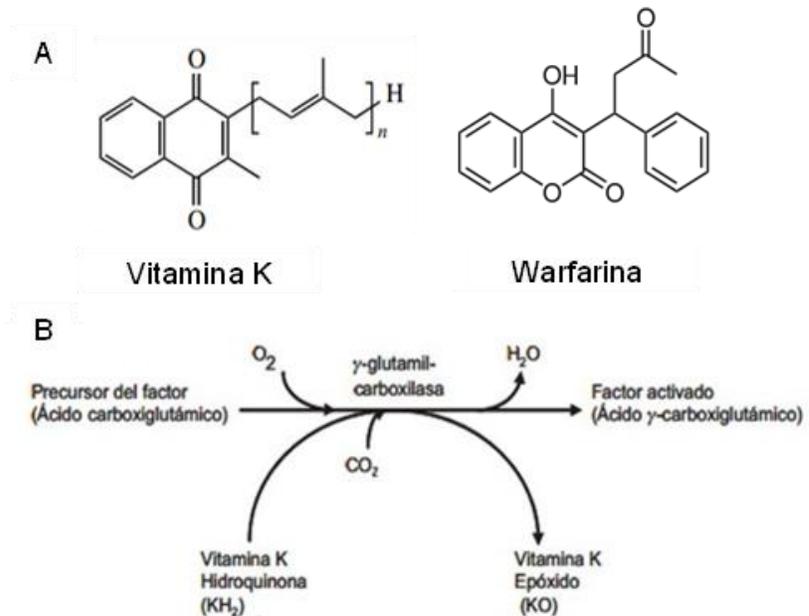
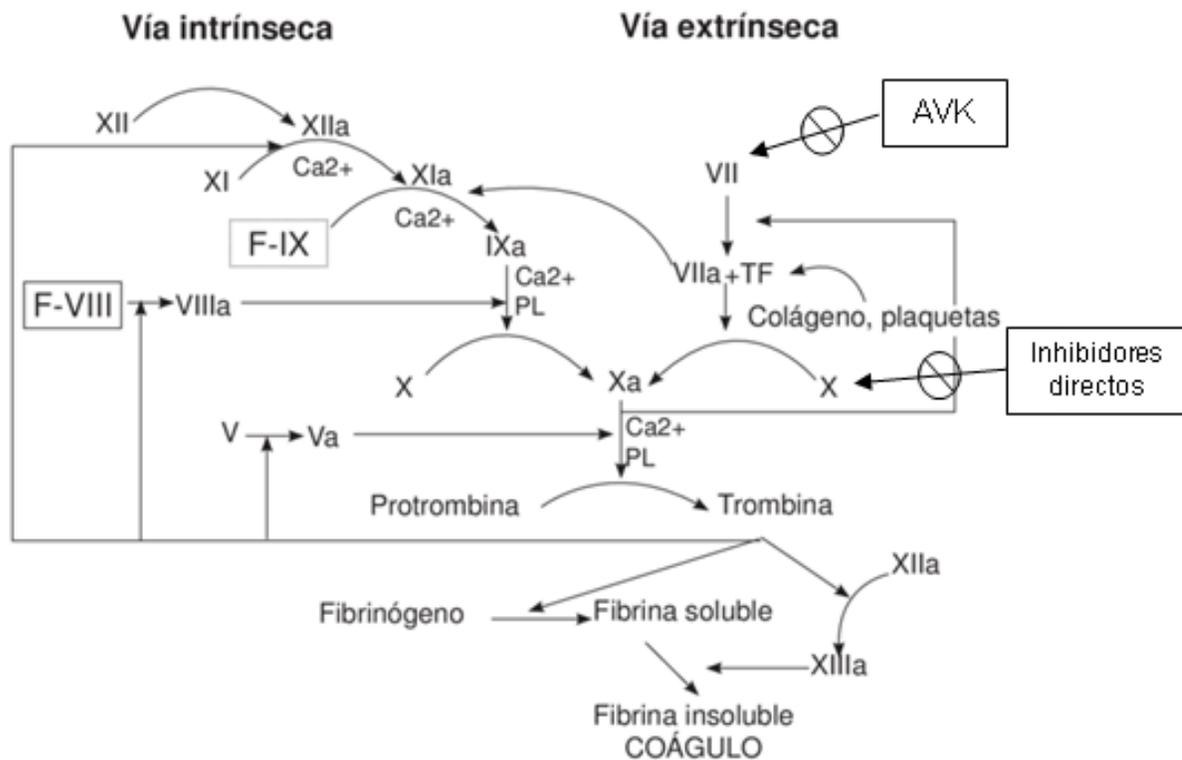


Figura 1. Mecanismo de acción de la warfarina

(A) Analogía estructural "Warfarina vs Vitamina K", (B) Ciclo de la vitamina K, regulación de la  $\gamma$ -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 de la warfarina.**

La warfarina 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). La warfarina 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.

La warfarina 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 la 7-Hidroxiwarfarina, que proviene 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 de la warfarina (18).

### **2.5.2 Variabilidad de la respuesta a warfarina.**

La warfarina 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 warfarina y el nivel al que impactan.

*Tabla 1. Factores involucrados en la variabilidad de la respuesta a warfarina*

<b>Factores</b>	<b>Efecto en la respuesta a warfarina</b>
<b>Edad y comorbilidades</b>	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. La warfarina es mayoritariamente metabolizada 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).
<b>Composición corporal</b>	La mayoría de los fármacos se dosifican principalmente tomando en cuenta el peso corporal del paciente, sin embargo, la warfarina 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 warfarina, 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).
<b>Dieta</b>	Un incremento en el consumo de alimentos ricos en vitamina K disminuyen el efecto anticoagulante de la warfarina. El consumo de este tipo de alimentos incrementa las concentraciones séricas de vitamina K compitiendo con la warfarina 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 de warfarina, 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).
<b>Interacciones farmacológicas</b>	Las interacciones farmacológicas causadas por un estado de polifarmacia en el paciente pueden modificar la respuesta a warfarina. A nivel farmacocinético se ubican aquellos medicamentos que inducen o inhiben el metabolismo de la warfarina (fluconazol, amiodarona, carbamazepina), y aquellos que pueden desplazar a la warfarina 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 espirolactona) (26).

<p><b>Polimorfismo CYP2C9</b></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><b>Polimorfismo VKORC1</b></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 la warfarina, 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><b>Factores ambientales</b></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 de warfarina 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 de la warfarina 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 warfarina las guías de práctica clínica, indican iniciar con una dosis estandarizada de warfarina (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 trombotico 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*

<b>Prueba</b>	<b>Descripción</b>	<b>Usos y aplicaciones</b>
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, la warfarina 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 la warfarina 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 de warfarina 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 de warfarina.**

Uno de los principales inconvenientes que se han reportado con respecto a la monitorización de warfarina, 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 de warfarina 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 la warfarina 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 de warfarina.**

Se han reportado una gran variedad de métodos analíticos por cromatografía de líquidos para determinar las concentraciones de warfarina 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 warfarina, 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 warfarina indicando su mecanismo de acción, así como el efecto final observado (2,15,44).

Tabla 3. Interacciones farmacológicas con warfarina

Fármaco(s)	Interacción	Mecanismo	Efecto observado
<b>Interacciones Farmacocinéticas</b>			
<b>Ácido acetilsalicílico</b>	Desplazamiento de la warfarina de su sitio de unión a albumina,	Fármacos que poseen mayor afinidad por el sitio de unión a albumina desplazan a la warfarina incrementando la fracción de fármaco libre responsable del efecto terapéutico.	Potenciación
<b>Ketoconazol, fluconazol, amiodarona, lovastatina.</b>	Inhibición de la isoenzima CYP2C9	Inhibición de la síntesis, o competición por los sitios activos favorece la bioacumulación de la warfarina incrementado su tiempo de vida media.	Potenciación
<b>Rifampicina, fenobarbital, carbamazepina.</b>	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
<b>Interacciones Farmacodinámicas</b>			
<b>Antibióticos, colestiramina</b>	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

<b>Acetaminofén y cefalosporinas (2da y 3era generación)</b>	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 la warfarina a la VKORC1, generando un efecto sinérgico como si se tratase de un incremento en la dosis.	Potenciación
<b>Diuréticos (Clortalidona y espironolactona)</b>	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 de la warfarina e incrementarse la capacidad coagulativa de la sangre.	Disminución
<b>Levotiroxina</b>	Disminución de los factores de coagulación.	Aumenta el metabolismo de los factores de coagulación disminuyendo su semivida en circulación sanguínea.	Potenciación
<b>AINES</b>	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.
<b>Antiagregantes plaquetarios (Clopidogrel)</b>	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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}/\text{día}$ . 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  $\mu\text{g}$  por cada 100 g de alimento. La validación del instrumento se efectuó en pacientes bajo tratamiento con warfarina, 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 de la warfarina**

Los polimorfismos asociados a la resistencia o sensibilidad de warfarina 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 de warfarina 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 de warfarina 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, en las cuales la warfarina representa una de las principales alternativas en el manejo de estas patologías debido a su gran accesibilidad en población mexicana. La optimización del uso de warfarina 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 con warfarina implica un periodo de intenso cuidado y monitoreo.

La mayoría del tiempo que transcurre mientras se efectúa el ajuste de dosis con warfarina, 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 de warfarina, la presencia de polimorfismos en la VKORC1 (1639), las interacciones medicamentosas, el consumo de vitamina K y las concentraciones plasmáticas de warfarina y su metabolito hidroxilado que tienen sobre el INR.

La identificación de los factores que influyen en el INR, serán de utilidad para optimizar la terapia anticoagulante con warfarina, incluyendo la medición de los niveles plasmáticos de este fármaco y su metabolito hidroxilado, lo cual 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 de warfarina, tales como interacciones farmacológicas, interacciones dietéticas, la edad, el polimorfismo VKORC1 y las concentraciones plasmáticas de warfarina y su metabolito hidroxilado (7-OH warfarina), 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 warfarina, así como su relación con las concentraciones plasmáticas de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con FA y enfermedades valvulares.

### **5.2 Objetivos específicos.**

- Validar y estandarizar la técnica de cuantificación para warfarina y su metabolito hidroxilado por HPLC/UV-Vis
- Determinar las concentraciones plasmáticas de warfarina 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 µg/día empleando un cuestionario de frecuencia de consumo (CFC).
- Determinar las concentraciones plasmáticas de warfarina 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) modelo Waters® (Milford,MA), acoplado a un detector de absorbancia dual UV/Vis 2487® y equipado con un desgasificador, bomba binaria y auto-muestreador (717 Plus Autosampler).
- Balanza analítica Explorer Pro OHAUS®
- Potenciómetro AQUASEARCHER™ OHAUS®
- Sistema de filtración al vacío “Millipore”.
- Ultracongelador “Thermo Scientific Orion 3-Star Benchtop”.
- Centrifuga refrigerada “Eppendorf 5804 R”.
- Concentrador de vacío “Eppendorf Vacufague Plus”
- Nanodrop Thermo Scientific
- Termociclador Applied Biosystems™ StepOne
- Centrifuga refrigerada Eppendorf (Centrifuge 5804 R, 15 amp versión)
- Incubadora de baño seco AOSHENG®

##### b) Reactivos

- Estándares de referencia certificados (Warfarina sódica, pureza 99.8% (No. Cas: 129-06-6), 7-OH warfarina, pureza 99% (No. Cas: 17834-03-6), metronidazol, pureza 99% (No. Cas: 443-48-1), fosfato de sodio monobásico, pureza 98.1% (No. Cas: 7558-80-7)) marca Sigma-Aldrich®.
- Agua desionizada, metanol y acetonitrilo HPLC/Spec marca TEDIA®
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.
- Sonda TaqMan™ (SNP – VKORC1 1639)
- PCR TaqMan™ Master mix
- Agua grado biología molecular
- Isopropanol grado biología molecular
- Alcohol etílico grado biología molecular

### **6.1.2 Estandarización del método analítico para la cuantificación de warfarina y 7-OH warfarina 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 de warfarina y 7-OH warfarina en plasma sanguíneo.

#### **6.1.2.1 Condiciones Cromatográficas**

Se efectuaron diferentes pruebas preliminares para determinar las condiciones cromatográficas que aseguraran la correcta separación de warfarina, 7-OH warfarina y metronidazol como estándar interno en muestras plasmáticas.

- Fase móvil: consistió en Buffer de fosfatos 10 mM, ajustado a un pH de 7, metanol y acetonitrilo en proporciones (72:5:23), con un sistema de bombeo isocrático a una velocidad de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. Se empleó una columna X-Terra RP18® (15 mm x 3.0 mm, 3.5  $\mu$ m).
- Longitud de onda ( $\lambda$ ): se determinó realizando el barrido UV para cada compuesto, en un rango de 250 a 350 nm, de una solución de 50  $\mu$ g/mL de cada compuesto en fase móvil. El detector de absorbancia dual UV-Vis se ajustó a una  $\lambda$  de máxima absorbancia para la detección simultánea de ambos analitos y el estándar interno (ANEXO I).
- 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.

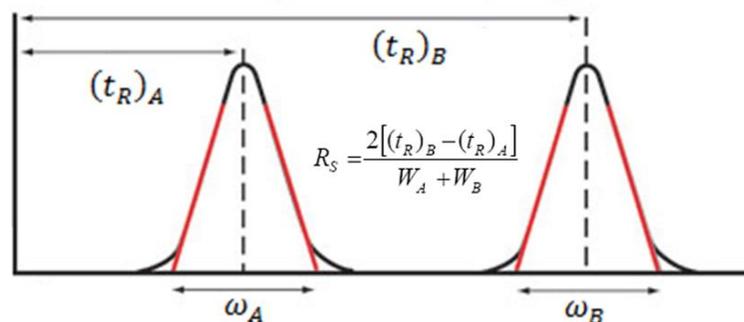


Figura 3. Ecuación cálculo de resolución entre picos.

$(T_R)_A$  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 µg/mL para warfarina, 7-OH warfarina y el estándar interno (metronidazol). 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

En la tabla 4 se muestra 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, se muestran el 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 de warfarina y 7-OH warfarina a una concentración de 10 µg/mL en plasma.

*Tabla 4. Preparación curva de calibración y controles de calidad*

Estándar	µL Solución de trabajo	Concentración de los analitos (µg/mL)	
		Warfarina	7-OH warfarina
<b>Curva de Calibración</b>			
<b>1</b>	10	0.1	0.1
<b>2</b>	50	0.5	0.5
<b>3</b>	100	1	1
<b>4</b>	200	2	2
<b>5</b>	300	3	3
<b>6</b>	500	5	5
<b>Muestras control de calidad</b>			
<b>CB</b>	30	0.3	0.3
<b>CM</b>	150	1.5	1.5
<b>CA</b>	400	4	4
<b>MCD</b>	600	6	6

#### **6.1.2.4 Método de extracción en muestras de plasma.**

En la figura 4, se observa el método de extracción de warfarina y 7OH-warfarina, a partir de muestras plasmáticas. Éste consistió en precipitar las proteínas de 300 µL de plasma, añadiendo 5 µL de estándar interno a una concentración de 150 µg/mL y 1 mL de acetonitrilo empleando agitación en vórtex y posterior centrifugación a una velocidad de 13,000 rpm a 4°C por 20 min. El sobrenadante se recuperó y se evaporó al vacío a una temperatura de 45°C hasta sequedad, y se resuspendió en 60 µL de fase móvil. Finalmente, se realizó una última centrifugación a velocidad de 13,000 rpm a 4°C por 10 min y el sobrenadante se colocó en viales para su inyección en el equipo.

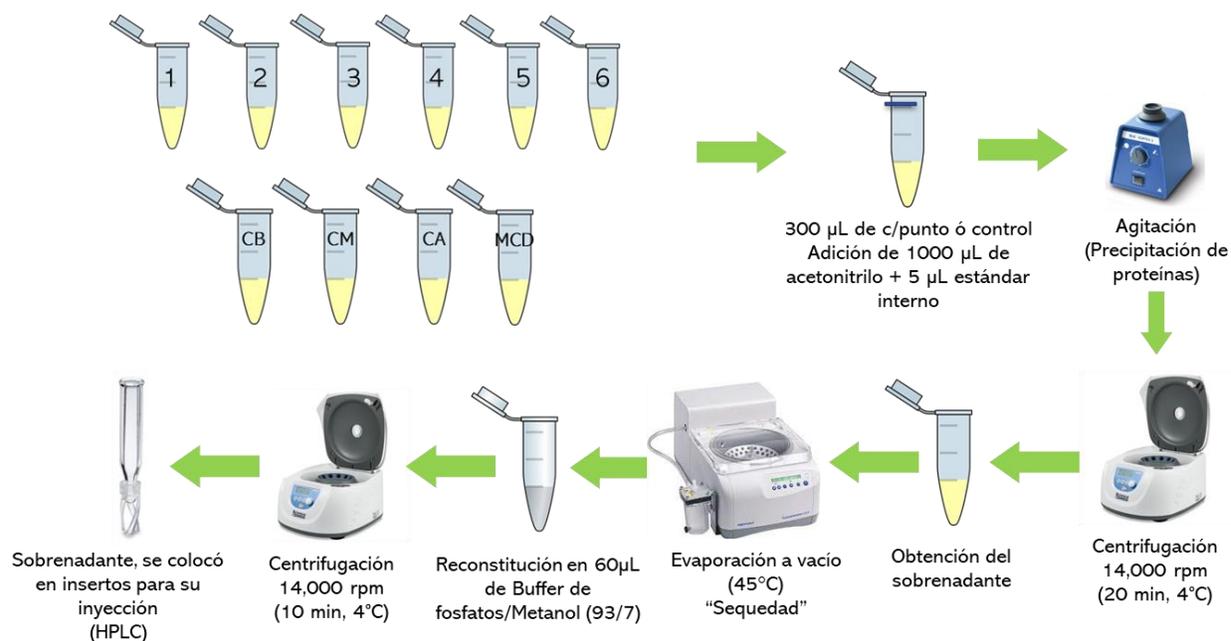


Figura 4. Extracción de warfarina y 7-OH warfarina a partir de plasma

### 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 (Tabla 4), 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  $-80^{\circ}\text{C}$ , 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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 (ANEXO II).

#### 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 400 µL de sangre venosa periférica. El ADN obtenido se cuantificó empleando el equipo NanoDrop Thermo Scientific. La concentración mínima requerida para llevar a cabo la reacción de amplificación fue de 100 ng/µL. 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

En la tabla 5 se observan los componentes y las cantidades empleadas para llevar a cabo la reacción de amplificación.

*Tabla 5. Componentes reacción de amplificación.*

<b>Componente</b>	<b>Muestra problema</b>	<b>Control negativo</b>
PCR TaqMan™ Master mix	3.0 µL	3.0 µL
Sonda TaqMan™ [C_30403262_20]	0.3 µL	0.3 µL
Agua grado biología molecular	Volumen suficiente	4.7 µL
Templado ADN	Volumen suficiente (100 ng de ADN)	----
<b>Volumen de reacción final</b>	8.0 µL	8.0 µL

#### 6.1.4.3 Condiciones termociclador

En la tabla 6 se observa el programa de termociclado para efectuar la reacción de amplificación.

*Tabla 6. Programa de termociclado para reacción de amplificación.*

<b>Activación enzimática</b>	<b>PCR (50 ciclos)</b>	
Incubación	Desnaturalización	Extensión
95°C (10 minutos)	92°C (15 segundos)	60° C (90 segundos)

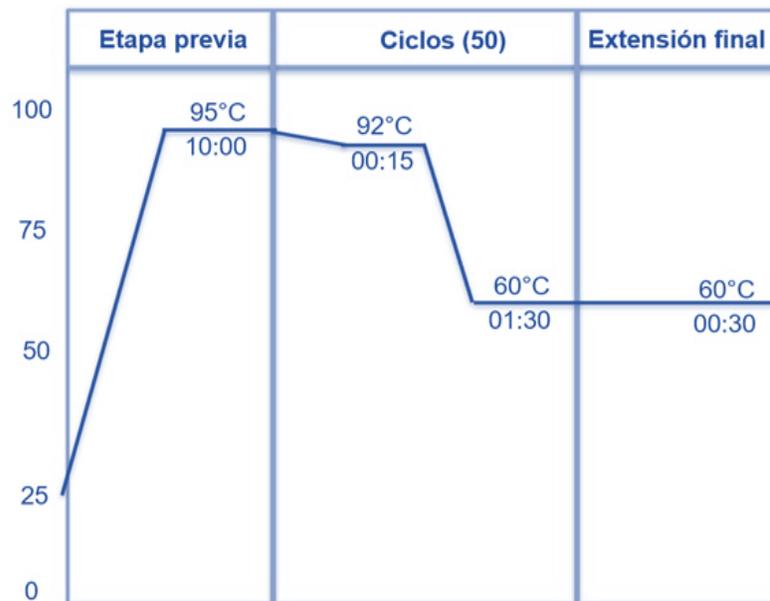


Figura 5. Gráfico de temperaturas para reacción de amplificación.

## 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 warfarina.

#### **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  $\geq 18$  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 warfarina 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 metronidazol 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 (ANEXO III). 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 (ANEXO IV).

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 (ANEXO V).

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

Previa valoración, los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a un breve cuestionario (ANEXO VI) 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 de warfarina, 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 warfarina. 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 7. Cuadro de operacionalización de variable

Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
<b>Dependientes</b>				
Índice normalizado internacional (INR)	Forma estandarizada del tiempo de protrombina Método de determinación: Automatizado – Coagulómetro	1 - 8	N/A	Continua
<b>Independiente</b>				
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 de warfarina.	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 7-OH warfarina	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

<b>Polimorfismo VKCOR1 1693</b>	Variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base. Polimorfismo implicado en la sensibilidad a warfarina. Método de Determinación: PCR tiempo real.	1) Ausente 2) Presente	N/A	Dicotómica
<b>Ratio metabólico</b>	Relación entre la forma inalterada del fármaco y su principal metabolito. Se expresa como el cociente de las concentraciones de warfarina y 7-OH warfarina.	0 - 100	N/A	Continua
<b>Variables de control o exploratorias (Se obtendrán del expediente clínico)</b>				
<b>Sexo</b>	Identificación que se le hace al paciente para diferenciar si pertenece al sexo masculino o femenino.	1) Masculino 2) Femenino	N/A	Dicotómica
<b>Edad</b>	Es el número de años cumplidos según la fecha de nacimiento.	18 – 80	Años	Continua
<b>IMC (Índice de masa corporal)</b>	Relación del peso por unidad de superficie corporal.	16 - 45	Kg/m <sup>2</sup>	Continua
<b>Escala HAS-BLED</b>	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
<b>Albumina sérica</b>	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” (Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427), con número de registro **72-21**(ANEXO VII.C), así como la aprobación por parte del Comité Estatal de Ética en investigación en Salud, con numero de registro **SLP/09-2021** (ANEXO VII.B).

Además, se realizó el registro del protocolo ante el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas “CEID-FCQ” (Registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) el pasado 24 de noviembre de 2021, obteniendo como número de registro **CEID2021-014-S**, se anexa carta de aprobación (ANEXO VII.C)

## 7. Resultados

### 7.1 Estandarización del método analítico de cuantificación

Se desarrolló, estandarizó y validó un método para la cuantificación simultánea en plasma de Warfarina y 7-OH warfarina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector UV-Vis.

#### 7.1.1 Condiciones cromatográficas.

En la tabla 8 se observan las condiciones cromatográficas finales del método analítico desarrollado.

*Tabla 8. Condiciones cromatográficas finales para la cuantificación de warfarina y 7-OH warfarina*

<b>Sistema cromatográfico</b>	HPLC – Modelo Waters®
<b>Columna</b>	Columna XTerra® RP18 (3.0x150 mm, 3.5 µm)
<b>Fase móvil</b>	Buffer fosfatos 10 mM, pH 7 + Metanol + Acetonitrilo (72:5:23)
<b>Sistema de bombeo</b>	Isocrático
<b>Flujo</b>	0.3 mL/min
<b>Detector</b>	Detector de absorbancia dual UV/Vis 2487®
<b>Longitud de onda (Detector)</b>	1 canal – 308 nm
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL

Las condiciones finales 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.

En la figura 6 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar una solución acuosa de los 3 compuestos a una concentración de 10 µg/mL empleando las condiciones cromatográficas previamente indicadas.

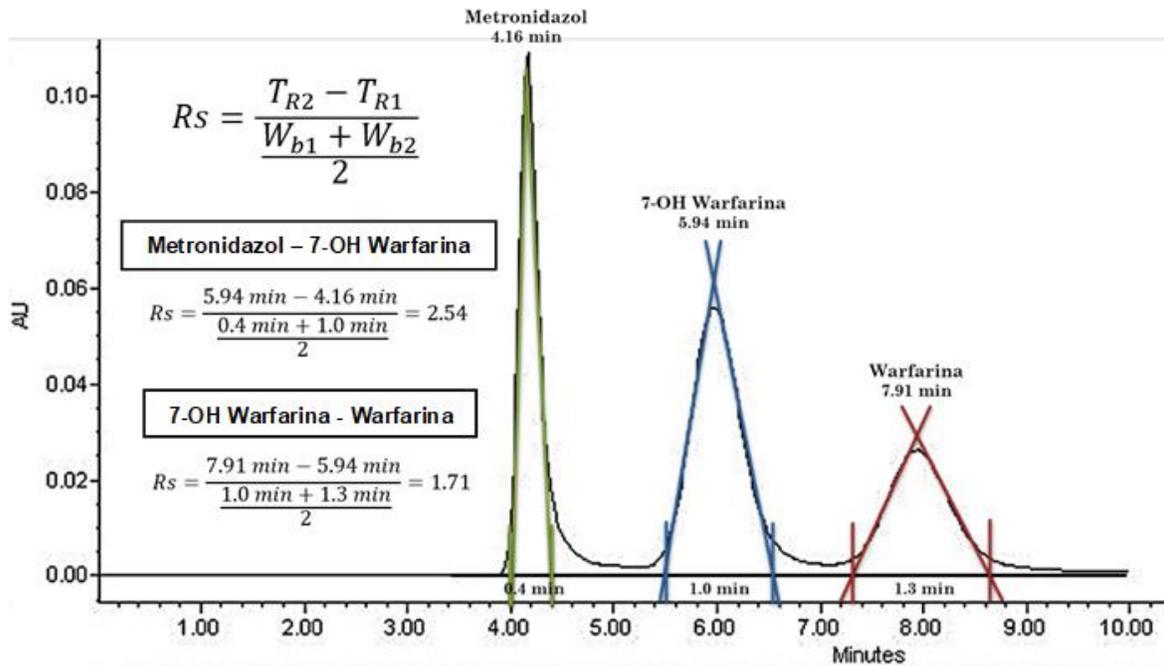


Figura 6. Cromatograma en agua que muestra la separación de warfarina, 7-OH warfarina y metronidazol (EI) en concentración de 10 µg/mL.

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 metronidazol, con un tiempo de retención de 4.16 min, seguido de la 7-OH warfarina con un tiempo de retención de 5.94 min y finalmente la warfarina con un tiempo de retención de 7.91 min.

La resolución entre el metronidazol y 7-OH warfarina presentó un valor de 2.54 y de 7-OH warfarina y warfarina de 1.71. 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.

En la figura 7, se muestra el cromatograma obtenido al inyectar una muestra control en matriz biológica (plasma), con adición de los 3 compuestos. Éste fue procesado con el método de extracción propuesto, a una concentración de 5 ug/mL y empleando las condiciones cromatográficas establecidas.

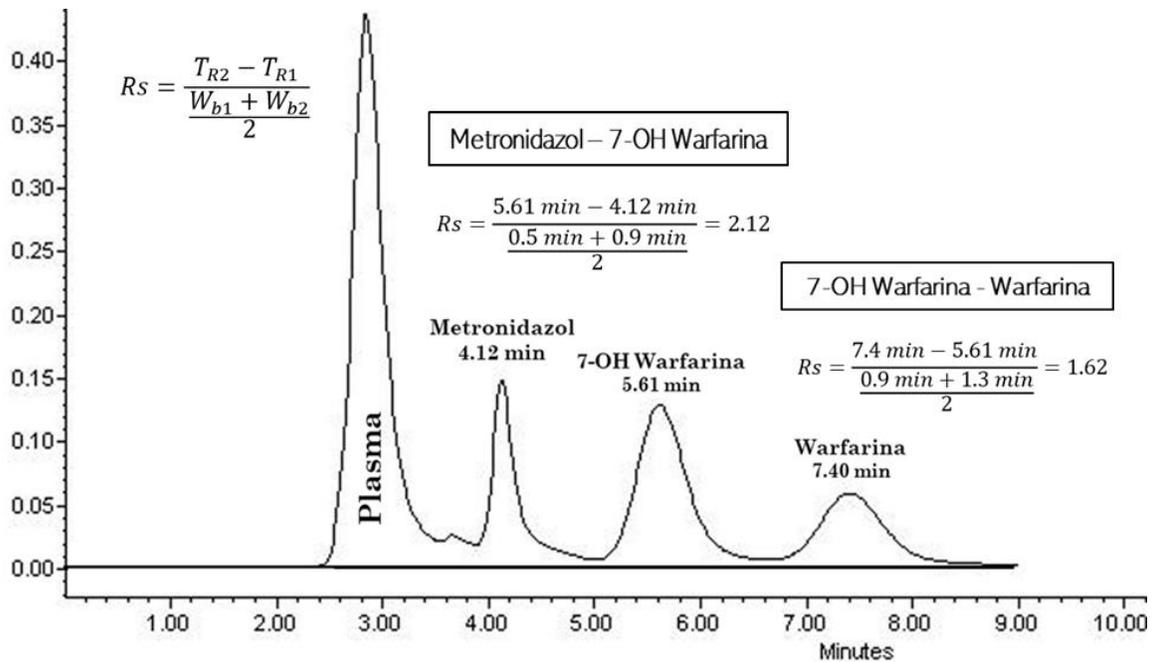


Figura 7. Cromatograma en plasma que muestra la separación de warfarina, 7-OH warfarina (5 µg/mL) y metronidazol (EI) (2.5 µg/mL).

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 metronidazol, con un tiempo de retención de 4.12 min, seguido de la 7-OH warfarina con un tiempo de retención de 5.61 min y finalmente la warfarina con un tiempo de retención de 7.40 min.

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 (metronidazol), la 7-OH warfarina y la warfarina 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 en el rango de concentraciones de 0.1 a 5 µg/mL para ambos analitos al obtener coeficientes de determinación de 0.9996 y 0.9998 para warfarina y 7-OH warfarina respectivamente en los cuales se caracterizaron 6 diferentes niveles de concentración.

En la tabla 9 se muestran el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV), de la respuesta analítica medida como el cociente del área bajo la curva del analito sobre el área bajo la curva del estándar interno. Se presentan los datos de la pendiente (m), ordenada al origen (b), el coeficiente de regresión (r) y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>). En la figura 8, se presentan las curvas de calibración para warfarina (A) y para 7-OH warfarina (B).

Tabla 9. Curvas de calibración para warfarina y 7-OH warfarina

Warfarina				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media (Warfarina/EI)	SD	%CV	Regresión lineal
0.1	0.027	154.60	11.95	m = 0.301 b = -0.0047 r = 0.99981 r <sup>2</sup> = 0.99963
0.5	0.145	155.20	5.17	
1	0.291	1189.68	6.28	
2	0.612	1089.63	2.76	
3	0.880	3291.79	5.51	
5	1.502	2027.12	2.56	
7-OH Warfarina				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media (7-OH Warfarina/EI)	SD	%CV	Regresión lineal
0.1	0.012	318.33	1.66	m = 0.496 b = -0.047 r = 0.99986 r <sup>2</sup> = 0.99973
0.5	0.197	798.34	2.03	
1	0.442	2762.60	3.50	
2	0.960	4097.51	2.10	
3	1.416	10403.44	2.70	
5	2.443	10632.86	1.95	

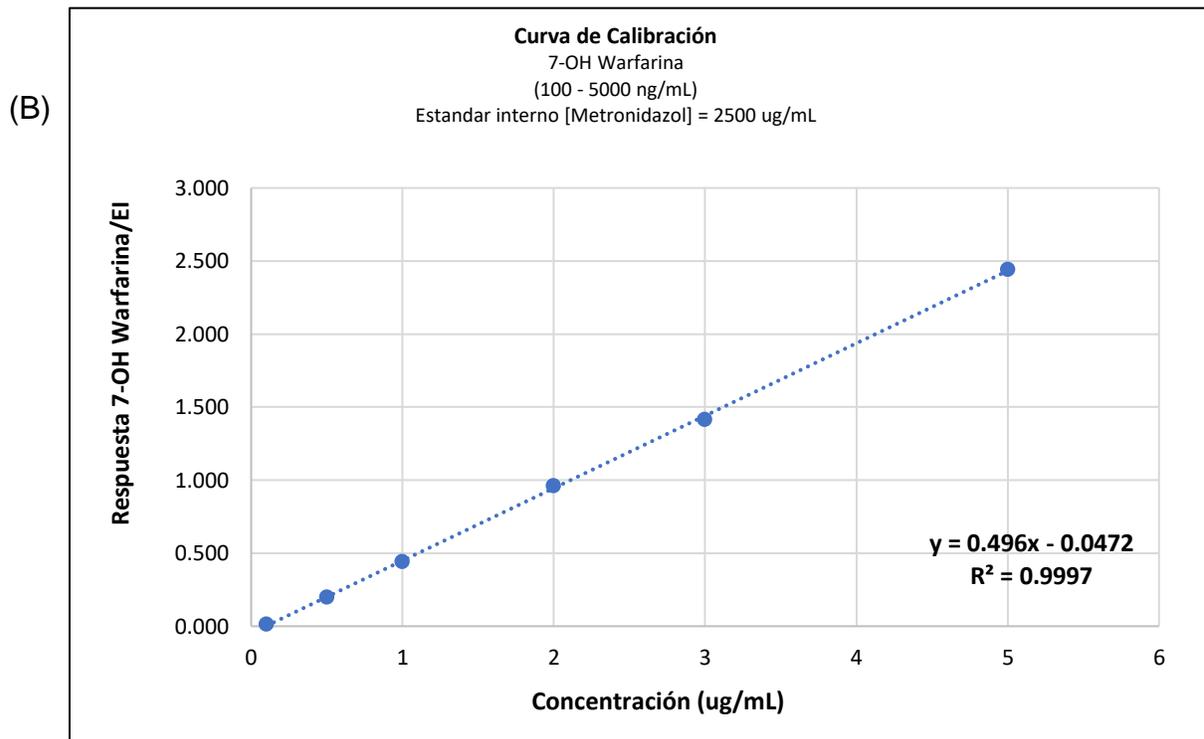
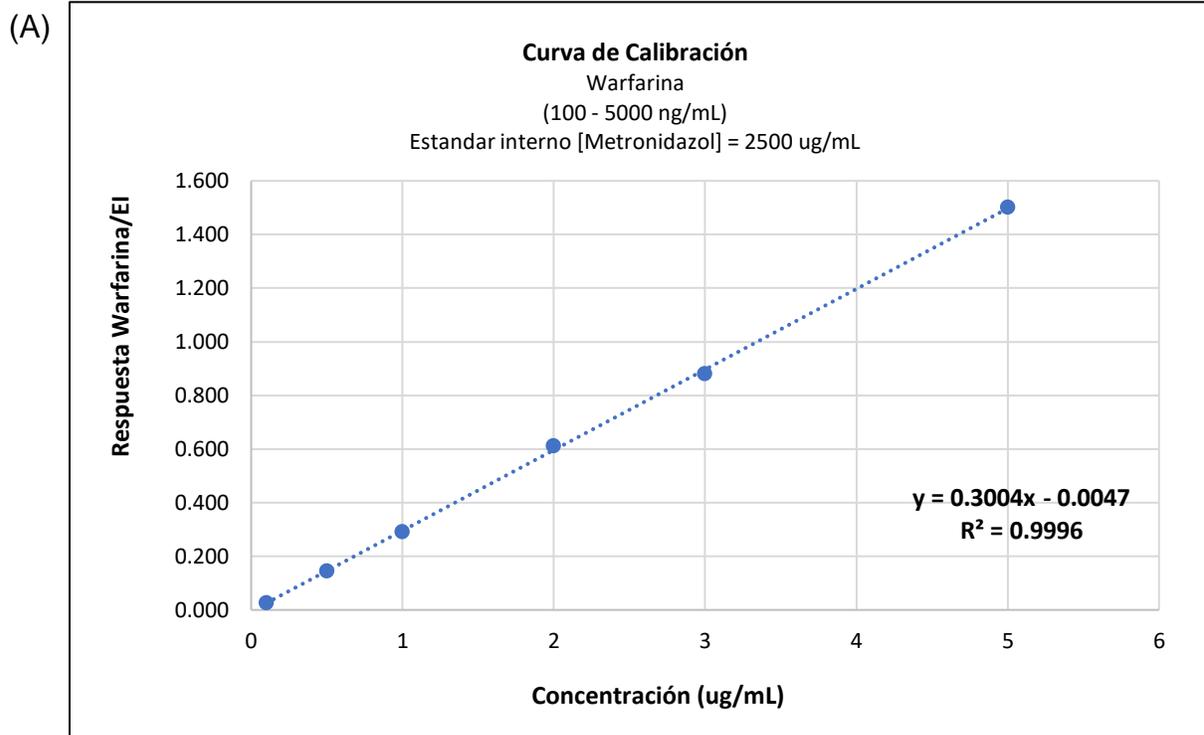


Figura 8. Curvas de calibración en plasma para A) Warfarina y B) 7-OH warfarina

### 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.

Los resultados obtenidos de precisión y exactitud se observan en la tabla 10 y 11 respectivamente.

*Tabla 10. Repetibilidad*

<b>Warfarina</b>					
<b>Muestra control n=5</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Media de la concentración obtenida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>	<b>%Desviación</b>
<b>LIC</b>	0.1	0.1	0.011	10.5	4.14
<b>MCB</b>	0.3	0.26	0.01	3.88	-12.93
<b>MCM</b>	1.5	1.55	0.056	3.64	-3.10
<b>MCA</b>	4.0	3.74	0.245	6.54	-6.44
<b>MCD</b>	3.0	2.88	0.073	2.54	-4.0
<b>7-OH Warfarina</b>					
<b>LIC</b>	0.1	0.12	0.003	2.51	19.13
<b>MCB</b>	0.3	0.28	0.015	5.33	-8.21
<b>MCM</b>	1.5	1.41	0.073	3.15	-5.82
<b>MCA</b>	4.0	3.88	0.174	4.48	-2.91
<b>MCD</b>	3.0	2.82	0.061	2.15	-6.02

*(DE) Desviación estándar, (%CV) Coeficiente de variación.*

Tabla 11. Reproducibilidad

Warfarina					
Muestra control n=15	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración obtenida (µg/mL)	DE	%CV	%Desviación
LIC	0.1	0.11	0.014	14.53	10.58
MCB	0.3	0.25	0.029	14.09	-1.78
MCM	1.5	1.39	0.101	5.82	4.63
MCA	4.0	3.8	0.445	7.84	1.85
7-OH Warfarina					
LIC	0.1	0.11	0.014	13.27	3.96
MCB	0.3	0.29	0.029	10.14	-6.25
MCM	1.5	1.57	0.101	6.44	-7.37
MCA	4.0	4.07	0.445	10.93	-3.04
<i>(DE) Desviación estándar, (%CV) Coeficiente de variación.</i>					

#### 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. En el ANEXO VIII se muestran los resultados obtenidos.

#### 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.

En las tablas 12 y 13, se muestran los resultados obtenidos de la estabilidad, así como ciclos congelación-descongelación.

*Tabla 12. Estabilidad de la muestra*

<b>Estabilidad 30 Días</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>Muestra control n=3</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Media de la concentración recuperada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% Desviación</b>
<b>MCB</b>	0.3	0.329	9.55
<b>MCM</b>	1.5	1.661	10.71
<b>MCA</b>	4	4.404	10.11
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.300	-0.075
<b>MCM</b>	1.5	1.374	-8.38
<b>MCA</b>	4	4.015	0.375
<b>Estabilidad 60 Días</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.322	7.38
<b>MCM</b>	1.5	1.492	-0.51
<b>MCA</b>	4	3.643	-8.93
<b>MCB</b>	0.3	0.332	10.56
<b>MCM</b>	1.5	1.558	3.84
<b>MCA</b>	4	4.331	8.28
<b>Estabilidad 90 Días</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.304	1.476
<b>MCM</b>	1.5	1.427	-4.85
<b>MCA</b>	4	4.25	-6.35

<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.271	-9.52
<b>MCM</b>	1.5	1.291	-13.94
<b>MCA</b>	4	3.699	-7.52
<b>Estabilidad 120 Días</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.328	-9.40
<b>MCM</b>	1.5	1.688	12.50
<b>MCA</b>	4	4.422	10.55
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.272	-9.23
<b>MCM</b>	1.5	1.517	1.12
<b>MCA</b>	4	4.406	10.14

*Tabla 13. Ciclos congelación descongelación*

<b>1 ciclo</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>Muestra control n=3</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>Media de la concentración recuperada (µg/mL)</b>	<b>% Desviación</b>
<b>MCB</b>	0.3	0.310	3.47
<b>MCM</b>	1.5	1.464	-2.38
<b>MCA</b>	4	4.019	0.49
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.294	-1.95
<b>MCM</b>	1.5	1.448	-3.49
<b>MCA</b>	4	3.877	-3.07
<b>2 ciclos</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.338	12.5
<b>MCM</b>	1.5	1.510	0.64
<b>MCA</b>	4	4.015	0.39

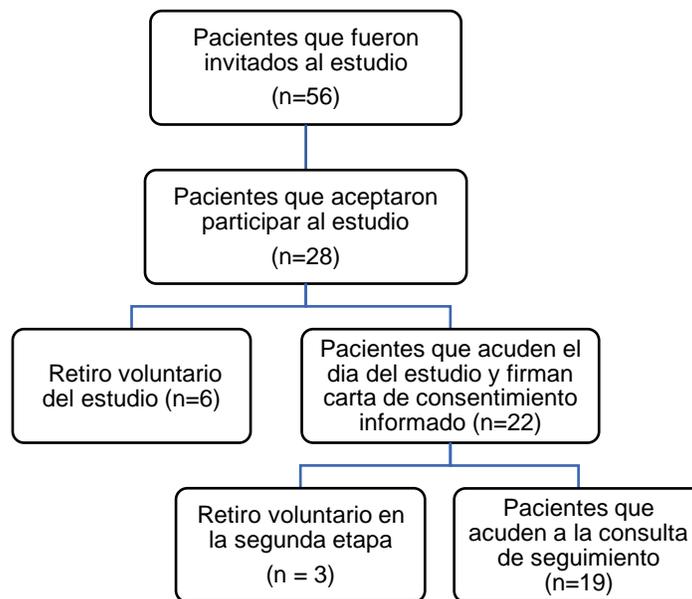
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.299	-0.37
<b>MCM</b>	1.5	1.447	-3.50
<b>MCA</b>	4	3.951	-1.22
<b>3 ciclos</b>			
<b>Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.333	11.15
<b>MCM</b>	1.5	1.492	-0.56
<b>MCA</b>	4	3.699	-7.52
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>MCB</b>	0.3	0.315	4.96
<b>MCM</b>	1.5	1.474	-1.71
<b>MCA</b>	4	3.793	-5.16

### 7.3 Estudio clínico

#### 7.3.1 Características demográficas y clínicas de la población

Se incluyeron 22 pacientes (64% mujeres), con rango de edad entre 33 a 72 años, residentes actuales del estado de San Luis Potosí, bajo tratamiento crónico con warfarina. La totalidad de los pacientes recibían atención médica de manera ordinaria en una institución pública .

El motivo de la prescripción de warfarina de los pacientes incluidos en el estudio se clasificó en 3 grupos; reemplazo valvular aórtico, reemplazo mitral y FA valvular, con un 45.5%, 36.4% y 18.2% de frecuencia, respectivamente. En la figura 9 se muestra el flujograma de la fase de reclutamiento de los pacientes. Se describe el total de pacientes que aceptaron participar en el estudio y los pacientes que no acudieron a su consulta de seguimiento.



*Figura 9. Flujograma de los pacientes que participaron en el estudio.*

En la tabla número 14 se resumen las características demográficas de la población de estudio, incluyendo los antecedentes patológicos y no patológicos, destacando una mayor prevalencia de mujeres dentro del estudio y 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  $2.28 \pm 1.03$  con un rango de 1.02 a 5.3; 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 de warfarina tuvo una media ( $\pm$  desviación estándar) de  $24.1 \pm 11.5$  y un rango de 8.75 a 52.4 mg/semana. La media del periodo de seguimiento de los pacientes fue de  $33 \pm 9$  días.

Los valores obtenidos durante la segunda visita fueron  $2.63 \pm 2.26$  para el INR, una dosis de mantenimiento de  $25 \pm 12.5$  mg/semana y un 45.5% de pacientes dentro de rango terapéutico.

*Tabla 14. Características demográficas basales de la población.*

*(Resultados de los antecedentes patológicos y no patológicos de la población de estudio).*

<b>Datos basales de la población (n=22)</b>			
<b>Variable</b>	<b>Resultado</b>	<b>Variable</b>	<b>Resultado</b>
<b>Edad (años)</b>		<b>Antecedentes patológicos</b>	
Mediana	60.0	Hipertensión arterial	45%
[Min, Max]	[33.0, 72.0]	Diabetes tipo II	23%
<b>Sexo</b>		Hipotiroidismo	23%
Femenino	14 (63.6%)	Dislipidemias	23%
Masculino	8 (36.4%)	Insuficiencia renal	18%
<b>Diagnostico</b>		<b>Antecedentes no patológicos</b>	
FA	4 (18.2%)	Tabaquismo	9%
Prótesis aórtica	10 (45.5%)	Alcoholismo	14%
Prótesis mitral	8 (36.4%)	<b>Índice de Comorbilidad de Charlson</b>	
<b>Peso (Kg)</b>		Media (SD)	2.09 (1.63)
Media (SD)	71.0 (12.9)	<b>Escala HAS-BLED</b>	
<b>Talla (m)</b>		Mediana	1
Media (SD)	1.59 (0.0905)	[Min, Max]	[0, 3]
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>		<b>Periodo de seguimiento (días)</b>	
Media (SD)	27.8 (3.71)	Media (SD)	34.5 (9.21)

*(FA) Fibrilación auricular, (IMC) Índice de masa corporal. Los resultados se reportan como: Desviación estándar (SD), mínimo y máximo [Min, Max] y porcentajes.*

En la tabla 15 se muestran los parámetros clínicos de los pacientes incluidos en el estudio, antes y después del periodo de intervención. Un total de 15 pacientes recibieron un ajuste de dosis basado en los valores del INR obtenidos durante la primera visita, 7 de ellos recibieron un incremento de la dosis semanal (INR<2) y los 8 restantes una disminución (INR>3.5).

*Tabla 15. Comparación de variables clínicas.*

*(Antes y después del periodo de intervención en los pacientes).*

<b>Variables clínicas (n=22)</b>		
<b>Variable</b>	<b>Primera consulta</b>	<b>Segunda consulta</b>
<b>PAS (mmHg)</b>		
Mediana	120	120
[Min, Max]	[95.0, 150]	[100, 150]
<b>PAD (mmHg)</b>		
Mediana	80.0	80.0
[Min, Max]	[50.0, 90.0]	[50.0, 90.0]
<b>PAM (mmHg)</b>		
Mediana	100	97.5
[Min, Max]	[77.5, 120]	[80.0, 115]
<b>Dosis warfarina (mg/semana)</b>		
Media (SD)	24.1 (11.5)	25.0 (12.5)
<b>TP (segundos)</b>		
Media (SD)	26.9 (12.0)	29.7 (26.4)
<b>INR</b>		
Media (SD)	2.28 (1.03)	2.63 (2.26)
<b>Clasificación de INR</b>		
[2 – 3.5]	7.0 (31.8%)	10.0 (45.5%)
<2	7.0 (31.8%)	9.0 (41.0%)
>3.5	8.0 (36.4%)	2.0 (9.0%)
<i>(FA) Fibrilación auricular, (IMC) Índice de masa corporal, (PAS) Presión arterial sistólica, (PAD) Presión arterial diastólica, (PAM) Presión arterial media, (TP) Tiempo de protrombina, (INR) Índice internacional normalizado. Los resultados se reportan como: Desviación estándar (SD), mínimo y máximo [Min, Max] y porcentajes.</i>		

### 7.3.2 Concentraciones plasmáticas de warfarina y 7-OH warfarina.

Se monitorizaron las concentraciones plasmáticas de warfarina y 7-OH warfarina de los 22 pacientes incluidos en el estudio. Se obtuvo un total de 41 concentraciones plasmáticas de warfarina (22 durante la primera visita y 19 durante la segunda) y 39 concentraciones plasmáticas de 7-OH warfarina (21 durante la primera visita y 18 durante la segunda). Adicional a las muestras de los pacientes que no se presentaron a su cita de seguimiento, una muestra correspondiente a un paciente polimedicado no pudo ser cuantificada debido a la presencia de interferencias cercanas al tiempo de retención del metabolito, por lo cual sus concentraciones no pudieron ser determinadas.

La media ( $\pm$  desviación estándar) de los valores de concentración para ambos analitos durante la primera visita fue de  $2.34 \pm 0.85 \mu\text{g/mL}$  y  $0.159 \pm 0.096 \mu\text{g/mL}$  para warfarina y 7-OH warfarina, respectivamente. Durante la segunda visita fue de  $2.35 \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$  y  $0.161 \pm 0.114 \mu\text{g/mL}$  para warfarina y 7-OH warfarina, respectivamente (Figura 10). Se obtuvo el ratio metabólico como el cociente de ambas concentraciones obteniendo un valor de  $21.8 \pm 19.6$  para la primera visita y  $30.6 \pm 39.6$  para la segunda visita (Figura 11).

Tabla 16. Análisis descriptivo de las concentraciones plasmáticas y ratio metabólico.

Variable	Primera consulta	Segunda consulta
<b>Concentración plasmática de warfarina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		
Media (SD)	2.34 (0.848)	2.35 (1.01)
[Min, Max]	[0.93, 3.90]	[1.11, 5.60]
<b>Concentración plasmática de 7-OH warfarina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		
Mediana (SD)	0.159 (0.096)	0.161 (0.114)
[Min, Max]	[0.019, 0.499]	[0.019, 0.430]
<b>Ratio metabólico ([Warfarina]/[7-OH warfarina])</b>		
Mediana (SD)	21.8 (19.6)	30.6 (39.6)
[Min, Max]	[6.24, 89.9]	[4.70, 159.0]

*Los resultados se reportan como: Desviación estándar (SD) y mínimo y máximo [Min, Max].*

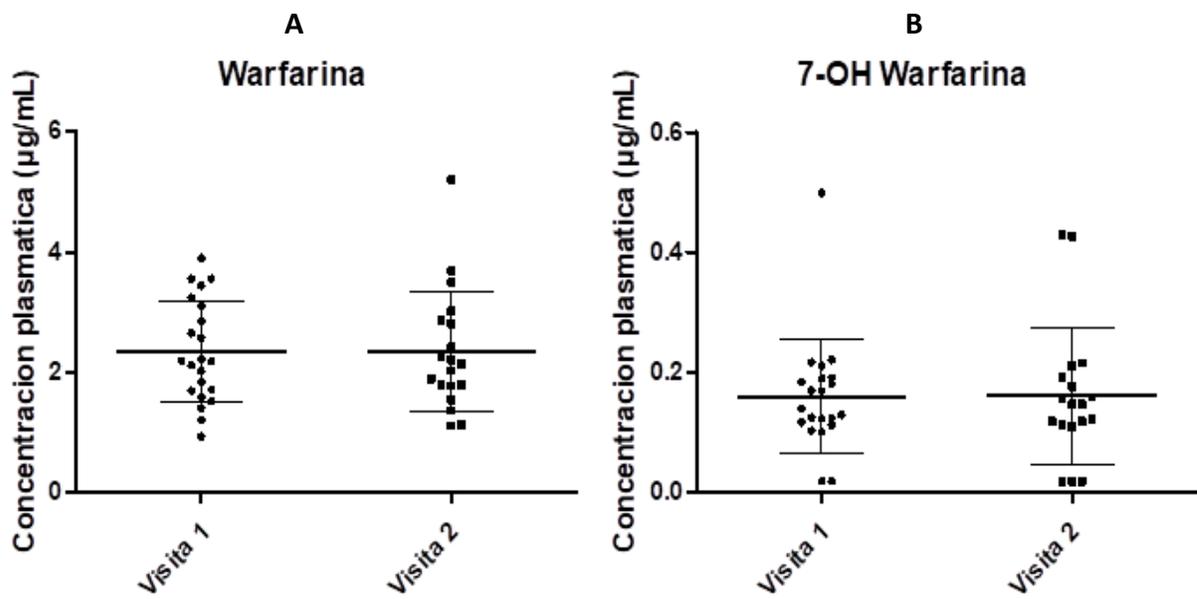


Figura 10. Comparación de las concentraciones plasmáticas entre la visita 1 y 2.

(A) Warfarina, (B) 7-OH warfarina.

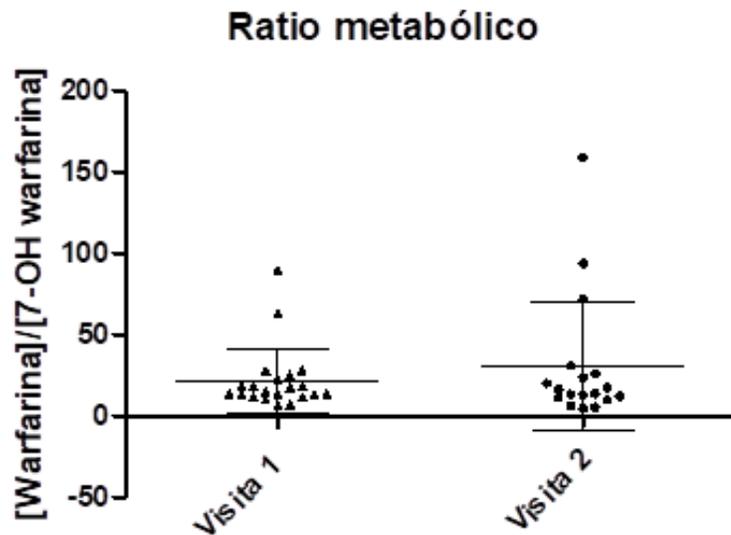


Figura 11. Comparación del ratio metabólico entre la visita 1 y 2

Se efectuó un análisis de regresión univariada para determinar el grado de asociación entre las concentraciones plasmáticas de warfarina, 7-OH warfarina y el ratio metabólico con la dosis de warfarina.

En la tabla 17 se observa que las concentraciones plasmáticas de warfarina 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.

*Tabla 17. Asociación entre las concentraciones plasmáticas y la dosis de mantenimiento.*

Variable	Primera visita		Segunda visita	
	*r	p-value	*r	p-value
Concentración plasmática de warfarina (mg/semana)	0.450	<b>0.03</b>	0.637	<b>0.003</b>
Concentración plasmática de 7-OH warfarina (mg/semana)	0.362	0.11	0.242	0.334
Ratio metabólico [Warfarina]/[7-OH warfarina]	-0.131	0.57	0.024	0.925

(r) Coeficiente de correlación Spearman

### 7.3.3 Genotipificación del polimorfismo VKORC1

El análisis de genotipificación se efectuó en las 22 muestras de los pacientes incluidos en el estudio. Para efectuar la reacción de amplificación se ajustó la concentración del templado de ADN a una concentración de 100 ng/μL. El alelo G marcado con el fluoróforo “VIC”, se identificó con el color verde y el alelo A marcado con el fluoróforo “FAM” se identificó con el color azul. En la figura 12 se observan los gráficos de amplificación ( $\Delta R_n$  vs Ciclos), en el que se observa el incremento de la fluorescencia con respecto a la fluorescencia basal del control negativo (Figura 12.A).

La genotipificación mostró la presencia de las 3 variantes polimórficas en la población de estudio. La variante homocigota “GG” (Figura 12.B), la variante heterocigota “GA” (Figura 12.C) y la variante homocigota “AA” (Figura 12.D). Se obtuvo el gráfico de amplificación por paciente para su interpretación (ANEXO IX).

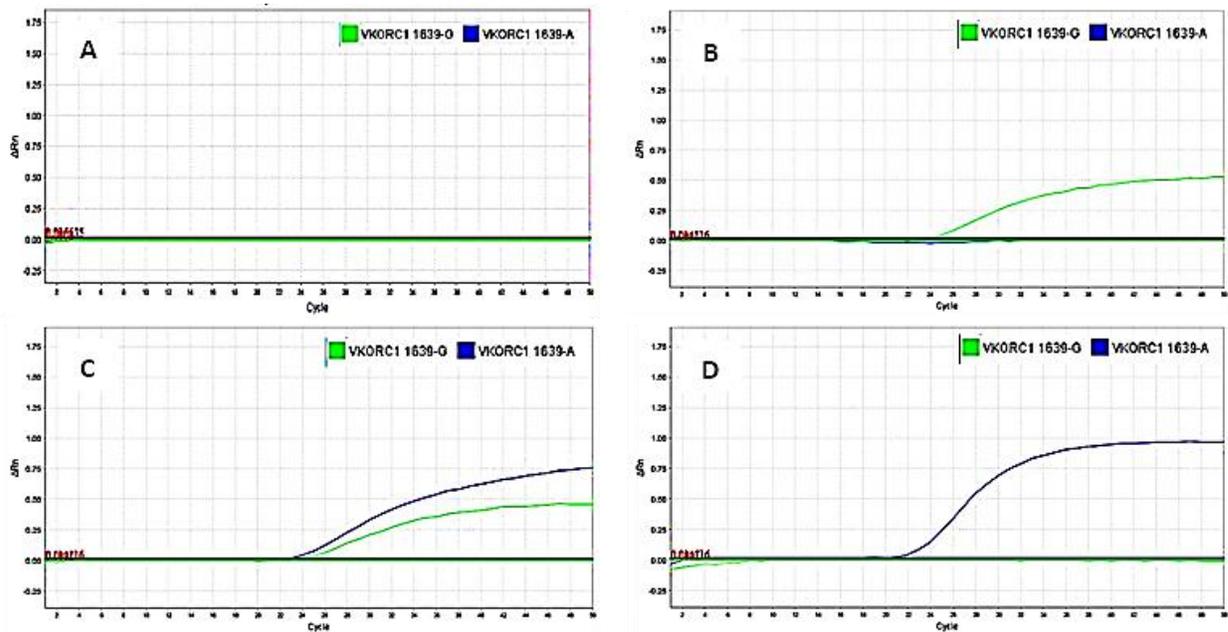


Figura 12. Gráficos de amplificación ( $\Delta Rn$  vs Ciclos)

19. Control Negativo, B. Homocigoto no mutado (GG), C. Heterocigoto (GA), D. Homocigoto mutado (AA).

En la Tabla 18. se muestra la comparación de 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.

Tabla 18. Comparación de las frecuencias genotípicas

(Comparación de las frecuencias observadas con las reportadas en la bibliografía).

Genotipo	Observados n=22	Frecuencia observada (%)	Frecuencia reportada en la bibliografía (%) n=300
GG	8	36.4	32.7
GA	11	50.0	47.0
AA	3	13.6	19.7
<i>Villegas y Cols. (2015)</i>			

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. Los resultados se resumen en la tabla 19.

*Tabla 19. Equilibrio de Hardy-Weinberg*

Polimorfismo	Genotipo	Observado	Alelos	Frecuencias alélicas	Frecuencias genotípicas	Valores esperados	Prueba X <sup>2</sup> HWE* (p-value)
<b>VKORC1 (1639)</b> Rs9923231	G/G	8	G	0.6136	0.3765	8	p=1
	G/A	11			0.4965	11	
	G/G	3	A	0.3863	0.1492	3	

\*(HWE) Equilibrio Hardy-Weinberg, (X<sup>2</sup>), Prueba Chi-cuadrada.

Se estratificó a los pacientes en función de su genotipo y se analizó su relación con la dosis de mantenimiento de warfarina expresada en mg/semana (Tabla 20). 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 (Figura 13. A). Esta relación que se vuelve aún más significativa durante la visita 2 (Figura 13.B) posterior a la modificación de dosis que se efectuó con base en los valores del INR.

*Tabla 20. Efecto del polimorfismo VKORC1 (1639) sobre la dosis de mantenimiento.*

Polimorfismo (n=22)	Visita 1	Visita 2
	DMS de warfarina (mg/semana)	
Media (SD)		
GG	30 (10.6)	32.5 (11.2)
GA	23 (11.2)	23.4 (11.5)
AA	12.5 (2.5)	10.8 (2.6)

*Dosis de mantenimiento semanal (DMS), Desviación estándar (SD)*

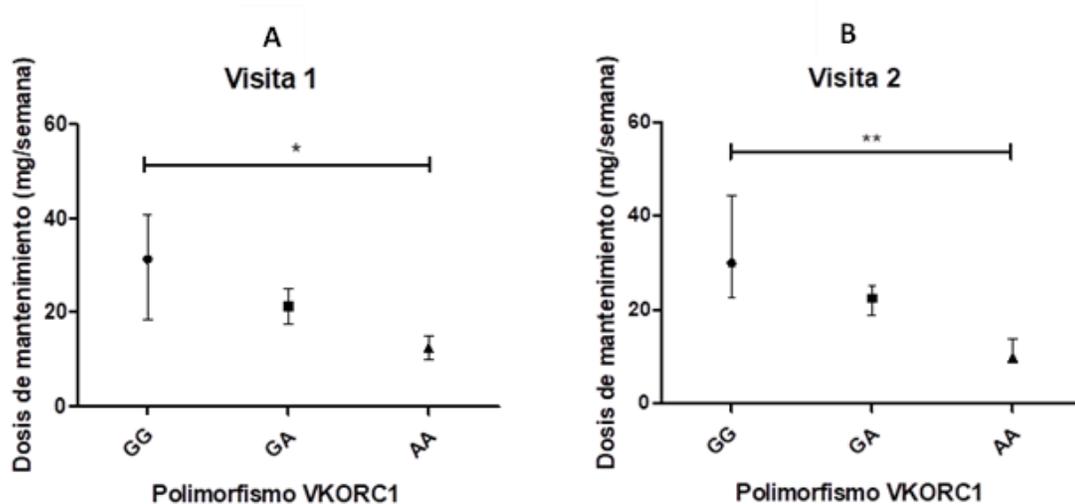


Figura 13. Efecto del polimorfismo VKORC1 1639 sobre la dosis de mantenimiento

(A). Visita 1, (B). Visita 2 (\*Anova Kruskal Wallis – Análisis postHoc prueba de Dunns, n=22).

Los valores del INR también se estratificaron en función del polimorfismo. En la figura 14.A se observa que durante la visita 1 lo 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 (Figura 14.B).

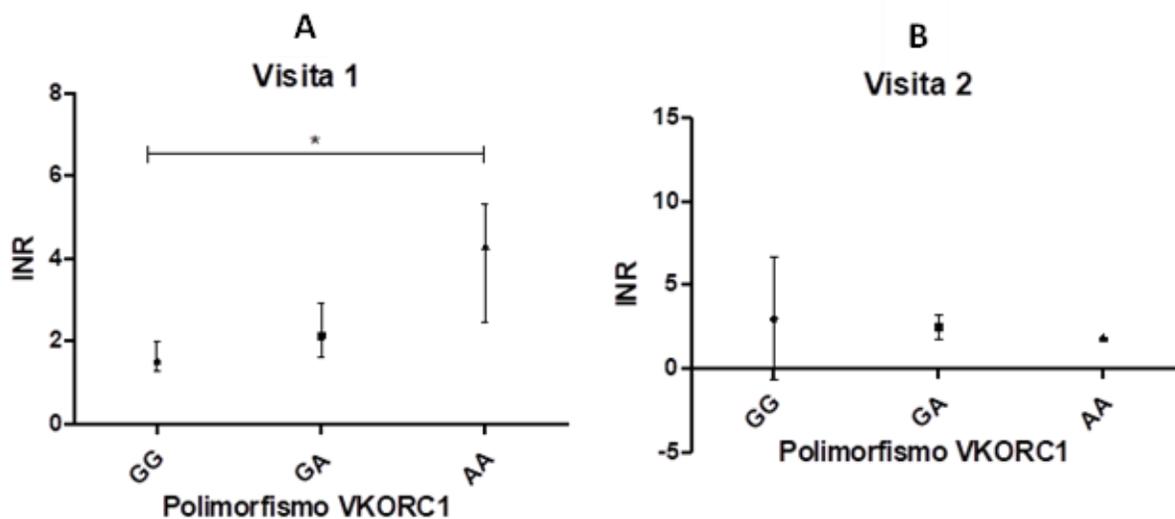


Figura 14. Efecto del polimorfismo VKORC1 1639 sobre el INR

(A). Visita 1, (B). Visita 2 (\*Anova Kruskal Wallis – Análisis postHoc prueba de Dunns, n=22).

### 7.3.4 Detección de interacciones medicamentosas con warfarina

Se detectó un total de 123 interacciones en el esquema de medicación de los 22 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 warfarina, con una mediana de 1.5 y un rango de 1 a 7 interacciones. En la tabla 21 se resume el análisis descriptivo de las interacciones observadas y clasificadas por su severidad, mecanismo de acción y efecto observado.

*Tabla 21. Análisis descriptivo de interacciones medicamentosas con warfarina*

Variable	% (n=47)
<b>Clasificación por su severidad</b>	
Mayores	21.2
Moderadas	68.1
Menores	10.6
<b>Clasificación por su mecanismo de acción</b>	
Farmacocinético	44.7
Farmacodinámico	55.3
<b>Clasificación por efecto observado</b>	
Potenciación	74.0
Inhibición	26.0

La clasificación de las interacciones con warfarina 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 de la warfarina, 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 los 22 pacientes incluidos en el estudio, obteniendo una media de  $36.7 \pm 23.2 \mu\text{g}/\text{día}$ . El consumo se estratificó en los 6 diferentes grupos de alimentos que el CFC evalúa (Figura. 15). Se observa 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.

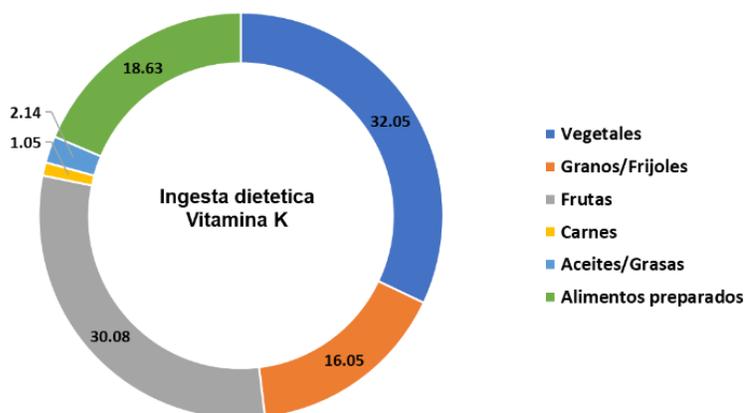


Figura 15. Aporte de vitamina K estratificado por grupos de alimentos

### 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 (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de regresión lineal univariada.

(Grado de asociación de las variables con el INR).

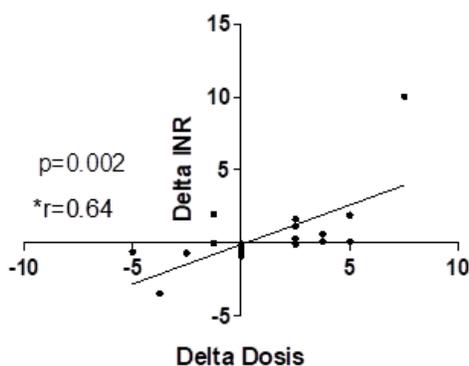
Variable predictora	Visita 1		Visita 2	
	"r"	p-value	"r"	p-value
Dosis de mantenimiento (mg/semana)	-0.196	0.38	0.264	0.25
Concentración plasmática de warfarina (mg/semana)	0.160	0.47	0.435	0.06
Concentración plasmática de 7-OH warfarina (mg/semana)	0.205	0.37	0.398	0.10
Ratio metabólico [Warfarina]/[7-OH warfarina]	-0.205	0.37	-0.062	0.80
Vitamina K (µg/día)	0.112	0.618	-0.081	0.73
Numero de interacciones con warfarina	-0.172	0.45	0.293	0.20
Índice de comorbilidad de Charlson	-0.090	0.69	0.097	0.67
Polimorfismo VKORC1 1639 (GG, GA y AA)*	<b>*p-value= 0.016</b>		<b>*p-value= 0.088</b>	
	GG vs GA, $p>0.05$		GG vs GA, $p>0.05$	
	GA vs AA, $p>0.05$		GA vs AA, $p>0.05$	
	<b>GG vs AA, <math>p&lt;0.05</math></b>		GG vs AA, $p>0.05$	
<i>(r)</i> Coeficiente de correlación Spearman, *Anova Kruskal Wallis (Análisis postHoc - Prueba de Dunns).				

Adicionalmente se evaluó la correlación entre las covariables y la magnitud del cambio observado en el INR (Delta INR). Los resultados se muestran en la Tabla 23. La única covariable que resultó ser significativa es el delta INR con la dosis de mantenimiento con un valor de  $r=0.64$  y  $p=0.002$  (Figura 16).

**Tabla 23. Análisis de regresión lineal multivariada**

(Grado de asociación de las variables con el delta INR).

Variable predictora	Deltas	
	"r"	p-value
Delta dosis de mantenimiento (mg/semana)	0.645	<b>0.002</b>
Delta concentraciones plasmática de warfarina	0.409	0.082
Delta concentración plasmática de 7-OH warfarina	-0.135	0.59
Delta ratio metabólico	0.292	0.24
Vitamina K (µg/día)	0.018	0.94
Numero de interacciones con warfarina	0.285	0.21
Índice de comorbilidad de Charlson	0.165	0.48
<b>Polimorfismo VKORC1 1639 (GG, GA, AA)*</b>	*p-value= 0.229 GG vs GA, p>0.05 GA vs AA, p>0.05 GG vs AA, p>0.05	
<i>(r) Coeficiente de correlación Spearman, *Anova Kruskal Wallis (Análisis postHoc - Prueba de Dunns).</i>		



**Figura 16. Análisis de correlación Spearman (Delta INR vs Delta dosis de warfarina)**

### 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 (Tabla 24).

*Tabla 24. Construcción de modelos saturados*

*(El modelo saturado solo pude tener 3 variables explicativas)*

Pool de variables	Posibles combinaciones de 3 covariables	Modelo saturado de mejor ajuste
Visita 1		
DW1, ICH, NIT, MR1, VK, VKORC1	20	<b><i>INR1 ~ ICH + NIT + VKORC1</i></b>
DW1, ICH, NIT, CPW1, CP7OH1, VKORC1	20	
Visita 2		
DW2, ICH, NIT, MR2, VK, VKORC1	20	<b><i>INR2 ~ ICH + CPW2 + CP7OH2</i></b>
DW2, ICH, NIT, CPW2, CP7OH2, VKORC1	20	
Deltas		
DeltaDW1, ICH, NIT, DeltaMR, VK, VKORC1	20	<b><i>DeltaINR ~ NIT + DeltaDW + DeltaCPW</i></b>
DeltaDW1, ICH, NIT, DeltaCP7OH, DeltaCPW, VKORC1	20	
<p><b>(DW)</b> Dosis de warfarina, <b>(ICH)</b> Índice de comorbilidad de Charlson, <b>(NIT)</b> Numero de interacciones <b>(MR)</b> Ratio metabólico, <b>(VK)</b> Ingesta de vitamina K, <b>(VKORC1)</b> Polimorfismo VKORC1 1639, <b>(CPW)</b> Concentraciones plasmáticas de warfarina, <b>(CP7OH)</b> Concentraciones plasmáticas, <b>(DeltaDW)</b> Delta dosis de warfarina, <b>(DeltaMR)</b> Delta ratio metabólico, <b>(DeltaCPW)</b> Delta concentraciones plasmáticas de warfarina, <b>(DeltaCP7OH)</b> Delta concentraciones plasmáticas de 7-OH warfarina.</p>		

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 de warfarina, concentraciones plasmáticas de warfarina y el polimorfismo genético VKORC1 1639 (Tabla 25).

Tabla 25. Modelo regresión lineal múltiple “Visita 1”

(Para explicar la variabilidad del INR reportado)

Variable	Estimado ( $b_x$ )	Error estándar	p-value	Eta <sup>2</sup>
DW1	-0.0034	0.5568	0.079	0.001
CPW1	0.3590	0.0175	0.133	0.070
VKORC1	2.5155	0.2127	<b>0.001*</b>	<b>0.513</b>

(**DW1**) Dosis de warfarina 1, (**CPW1**) Concentración plasmática de warfarina 1, (**VKORC1**) Polimorfismo VKORC1 1639  
 Modelo de regresión lineal múltiple que explica la variabilidad del INR.  
**R<sup>2</sup> ajustada = 0.5223, p-value=0.002, Intercepto= 1.6682,  $\Sigma$ Eta<sup>2</sup>=0.584**  
**Ecuación del modelo: INR= 1.6682 – 0.0035 (DW1) + 0.359 (CPW1) + 2.5155 (GA/AA)**

En este modelo el polimorfismo genético muestra una asociación positiva con el INR (p=0.001, eta<sup>2</sup>=0.513) además de las concentraciones plasmáticas de warfarina, mientras que con la dosis de warfarina 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 de warfarina y concentración plasmática de 7-OH warfarina (Tabla 26).

*Tabla 26. Modelo regresión lineal múltiple “Visita 2”*

*(Para explicar la variabilidad del INR reportado)*

Variable	Estimado ( $b_x$ )	Error estándar	p-value	Eta <sup>2</sup>
ICH	0.386	0.179	<b>0.003 **</b>	0.097
CPW2	1.340	0.301	<b>4.36 x10<sup>-5</sup> ***</b>	0.416
CP7OH2	8.526	2.812	<b>0.009 **</b>	0.193

*(ICH) Índice de Charlson, (CPW2) Concentración plasmática de warfarina, (CP7OH2) Concentración plasmática de 7-OH warfarina. Modelo de regresión lineal múltiple que explica la variabilidad del INR.*  
 **$R^2$  ajustada = 0.757, p-value=3.6x10<sup>-5</sup>, Intercepto (b)= 2.7212,  $\sum$ Eta<sup>2</sup>=0.708**  
**Ecuación del modelo:** INR = 2.7212 + 0.386 (ICH) + 1.340 (CPW) + 8.526 (CP7OH)

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,  $p = 3.67 \times 10^{-5}$  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 de warfarina y su metabolito podrían considerarse como los mejores predictores de la respuesta terapéutica a warfarina.

### 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 de warfarina y delta de la dosis de warfarina (Tabla 27).

Tabla 27. Modelo regresión lineal múltiple “Deltas”

Variable	Estimado ( $b_x$ )	Error estándar	p-value	Eta <sup>2</sup>
ICH	0.169	0.295	<b>0.043 *</b>	0.014
DeltaDW	0.369	0.178	<b>0.001 **</b>	0.179
DeltaCPW	1.656	0.798	<b>0.055</b>	0.179

*(ICH) Índice de Charlson, (DeltaDW) Delta de la dosis de warfarina, (DeltaCPW) Delta concentraciones plasmáticas de warfarina. Modelo de regresión lineal múltiple que explica la variabilidad del delta INR.*  
 **$R^2$  ajustada = 0.54, p-value=0.002, Intercepto(b)= -0.2490,  $\Sigma$ Eta<sup>2</sup>=0.372**  
**Ecuación del modelo:**  $\Delta\text{INR} = -0.2490 + 0.169 (\text{ICH}) + 0.369 (\text{DeltaDW}) + 1.656 (\text{DeltaCPW})$

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 de warfarina y 7-OH warfarina. 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 de 300 µL.

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 warfarina.

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, warfarina y 7-OH warfarina. 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 logró la inclusión de 22 pacientes, observando 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 de warfarina 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 de warfarina.

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 warfarina 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 de warfarina,  $2.34 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$  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  $3.47 \pm 1.87$  (n=178) y  $3.01 \pm 2.48$  (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 de warfarina 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 de 7-OH warfarina fue de  $0.159 \pm 0.096$  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 de 7-OH warfarina 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 de la warfarina es un proceso saturable, razón por la cual no es posible observar un incremento en la producción de metabolito si la concentración de warfarina 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 de warfarina.

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 de la warfarina. La warfarina 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 genóticas del polimorfismo VKORC1 (1639) en la población de estudio. Las frecuencias genóticas 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 ( $30 \pm 10.6$  mg) comparado con la variante AA, que requiere una dosis menor ( $12.5 \pm 2.5$  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  $\pm 11.2$ ) y una ligera disminución para los individuos del genotipo AA ( $10.8 \pm 2.6$  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 warfarina 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 ( $1.87 \pm 0.14$ ) en comparación a la variante GA ( $1.32 \pm 0.15$ ). 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 warfarina, 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 warfarina. 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 warfarina 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 de warfarina 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 de la warfarina. 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 warfarina. 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 warfarina 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  $\mu\text{g}/\text{día}$  en el caso de mujeres y 120  $\mu\text{g}/\text{día}$  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 28).

Tabla 28. 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 <sup>2</sup> (%)	Variabilidad explicada
<b>MODELOS REPORTADOS EN LA BIBLIOGRAFIA</b>						
Hillman cols. (EUA, 2004)	453	Dosis warfarina (mg/día)	CYP2C9 variante 3*	-	NR	33.7%
			Edad	-		
			Superficie corporal	+		
			Superficie corporal <sup>2</sup>	-		
			Reemplazo valvular	+		
			Diabetes	-		
			Edad x Diabetes	-		
Herman y cols. (Slovenia, 2005)	59	Ln (Dosis warfarina) (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 warfarina) (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 warfarina (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	<b>Ln (Dosis warfarina) (mg/día)</b>	VKORC1 1639 (GG, GA, AA)	-	<b>30.3</b>	<b>55%</b>
			CYP2C9 2* o 3*	-	8.2	
			Edad	-	8.2	
			Superficie corporal	+	3.7	
			Tromboembolismo venoso	+	4.5	
Gemmati y cols. (Japón, 2016)	133	<b>INR</b>	Cp de warfarina (µg/mL)	NR	p=0.142	<b>NR</b>
			Cp de 3-OH warfarina (µg/mL)		<b>p=0.002</b>	
			Dosis semanal (mg/semana)		p=0.076	
			CYP2C9		p=0.317	
			VKORC1		p=0.866	
<b>MODELOS DESARROLLADOS EN EL ESTUDIO</b>						
Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Visita 1"	22	<b>INR</b>	Dosis de warfarina (mg/semana)	-	0.1	<b>58.4%</b>
			Cp de warfarina (µg/mL)	+	7.0	
			VKORC1 1639 (GG, GA, AA)	+	51.3	
Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Visita 2"	22	<b>INR</b>	Índice de comorbilidad de Charlson	+	9.7	<b>70.6%</b>
			Cp de warfarina (µg/mL)	+	41.6	
			Cp de 7-OH warfarina (µg/mL)	+	19.3	
Rodríguez y cols. (México, 2022) Modelo "Deltas"	22	<b>Δ INR</b>	Índice de comorbilidad de Charlson	+	1.4	<b>37.2%</b>
			Δ Dosis de warfarina (mg/semana)	+	17.9	
			Δ Cp de warfarina (µg/mL)	+	17.9	

Como se puede observar en la Tabla 28, la mayoría de los modelos reportados emplean como variable dependiente a la dosis de warfarina 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  $\text{Eta}^2$  muy bajos, 0.09 y 0.037 respectivamente, lo que significa que dicho parámetro nos 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  $\text{Eta}^2$  de 0.01. Al respecto Xue y cols., señalan que la composición corporal no influye en el volumen de distribución y aclaramiento de la warfarina 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 de la warfarina, 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  $\text{Eta}^2$  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  $\text{Eta}^2$ , atribuyéndoles el mayor porcentaje de la variabilidad explicada para la dosis de warfarina. 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  $\text{Eta}^2$  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 ( $\text{Eta}^2=0.097$ ).

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 la 3-OH warfarina, metabolito activo de la warfarina, 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 de warfarina, 7-OH warfarina 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 de warfarina, no fue posible realizar un comparación directa del grado de explicabilidad 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 de warfarina y 7-OH warfarina en plasma conforme a la NOM-177-SSA1-2013. El método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 5 µg/mL 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 de warfarina y 7-OH warfarina de 22 pacientes bajo tratamiento anticoagulante.
- 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 warfarina 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 warfarina 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 de warfarina y las concentraciones plasmáticas del metabolito hidroxilado, por lo que podrían ser considerados como los mejores predictores de la respuesta terapéutica a warfarina.

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. Warfarina: 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](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 la 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 warfarina 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 la warfarina 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](http://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](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.

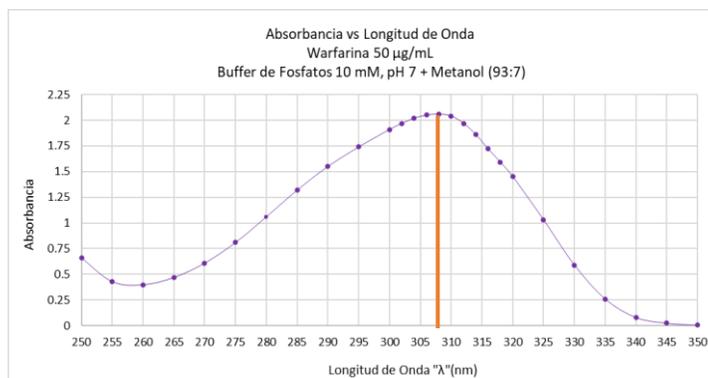
65. Cavallari LH, Momary KM, Patel SR, Shapiro NL, Nutescu E, Viana MAG. Pharmacogenomics of Warfarin dose requirements in Hispanics. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2011 Feb 15;46(2):147–50.
66. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Michael Stein C, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 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. ANEXOS

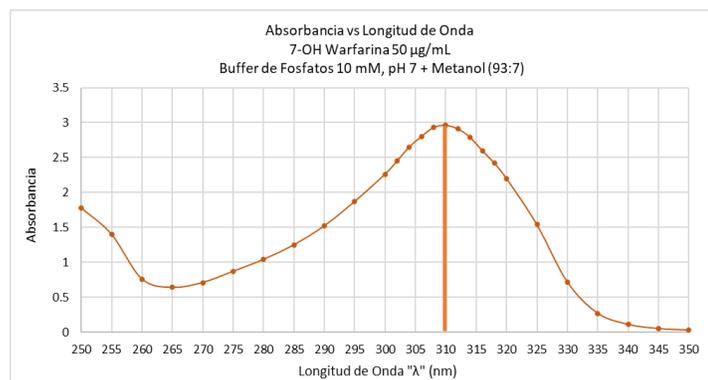
## ANEXO I. BARRIDOS UV

Barridos UV (250-350 nm) de soluciones estándar de Warfarina (A), 7-OH warfarina (B) y Metronidazol (C) en fase móvil a 50 µg/mL.

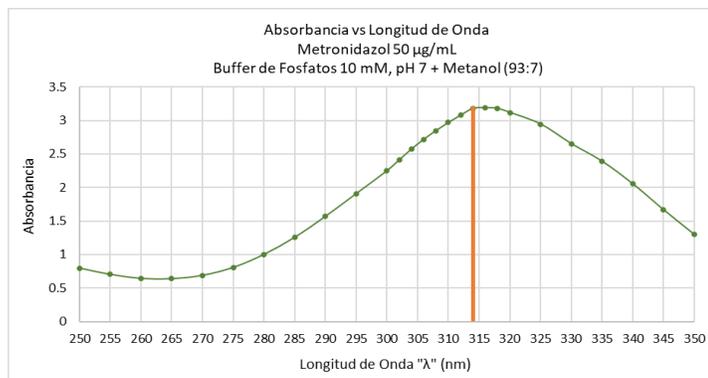
(A)



(B)



(C)



## ANEXO II. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE AND

Kit de extracción “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”

1. A 400 uL de sangre fresca agregar 900 uL de buffer de lisis celular
2. Mezclar por inversión 5 a 6 veces
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 min
4. Centrifugar a 13000 rpm 2 min
5. Descartar el sobrenadante y añadir 300 uL del buffer de lisis nuclear
6. Resuspender y agitar por pipeteo
7. Añadir 100 uL de precipitante de proteínas
8. Agitar en el vortex
9. Centrifugar a 13,000 por 3 minutos
10. Recuperar el sobrenadante en otro tubo y añadir 300 uL de isopropanol
11. Mezclar por inversión y refrigerar 30 min (4°C)
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos
13. Descartar sobrenadante
14. Añadir 300 uL de etanol al 70%
15. Centrifugar 13,000, 2 minutos y descartar el sobrenadante
16. Secar a 65°C por 10 min (Hasta sequedad)
17. Añadir 50 uL de solución rehidratante

## ANEXO III. INFOGRAFÍA RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

### ¿ESTAS BAJO TRATAMIENTO CON WARFARINA?



### ¡PARTICIPA EN NUESTRO ESTUDIO CLÍNICO!

#### ¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO?

El objetivo del estudio es conocer mediante un análisis de sangre la cantidad de este medicamento en el organismo que en conjunto con un análisis genético se pueda determinar cual es la dosis ideal que le corresponde a cada paciente.

#### ¿CUÁL ES MI PARTICIPACIÓN?

Si decide participar y cumples con los requisitos se te citará en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas (Avenida Dr. Manuel Nava Num. 6, Zona Universitaria). Deberá firmar una carta de consentimiento informado y posteriormente se realizará la toma de una muestra sanguínea. Se efectuará un breve cuestionario y una valoración por parte de un cardiólogo. Finalmente se le citará 30 días posteriores a su primera visita para seguimiento y recomendaciones finales.

#### CONSIDERACIONES ÉTICAS

Nuestro estudio clínico es considerado una investigación de riesgo mínimo. Contamos con la aprobación de diferentes comités de ética en investigación para poder efectuar su realización.

Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud.



POTOSÍ  
PARA LOS POTOSINOS  
GOBIERNO DEL ESTADO 2011-2017

SALUD  
SERVICIOS DE SALUD

Registro: SLP/09-2021

Comité de Ética en Investigación y docencia, FCQ, UASLP.



Registro: CEID2021-014-S

### REQUISITOS

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- \*Personas de ambos sexos mayores a 18 años
- \*Estar bajo tratamiento con warfarina (1 mes)
- \*Pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular o enfermedades valvulares.
- \*Pacientes que acepten participar mediante firma de consentimiento informado.

#### CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- \*Pacientes que durante el estudio estén bajo tratamiento con metronidazol.

### BENEFICIOS

- \*Valoración gratuita por cardiólogo.
- \*Análisis e interpretación de los niveles sanguíneos de warfarina.
- \*Estudio genético de sensibilidad a warfarina.

### INSTITUCIONES PARTICIPANTES.

\*Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

\*Laboratorio de investigación traslacional en farmacología, Facultad de Medicina, UASLP.



### ¿CUMPLES CON LOS REQUISITOS?

¡CONTACTANOS!

Tel. 444 242 0120  
QFB. Omar Rodríguez Pérez

Investigadores:

- Dr. Juan Manuel López Quijano
- Dra. Úrsula Fabiola Medina Moreno
- Dr. Antonio Gordillo Moscoso
- Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
- Dra. Silvia Romano Moreno
- Dr. Juan Manuel Vargas Morales
- Dra. Susanna Edith Medellín Garibay

## ANEXO IV. CARTA APROBACIÓN DE ENMIENDA COMITÉ ESTATAL



SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO  
SAN LUIS POTOSÍ



DG/DAM/SCES/OF. 04026 /2022

2 de marzo de 2022  
Código: 16S.1

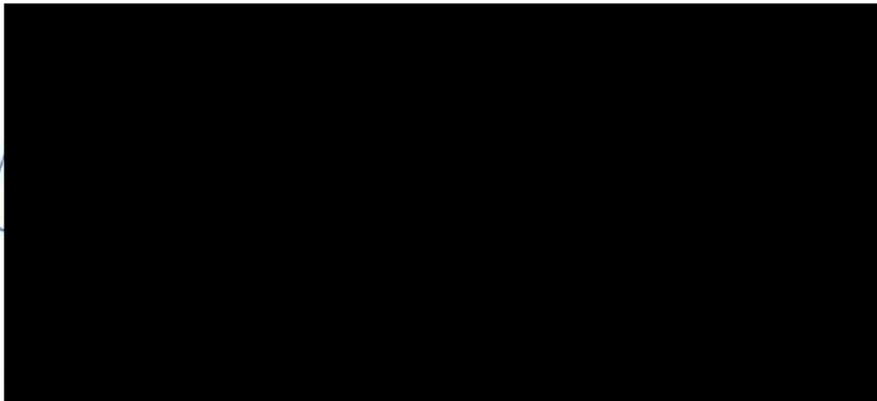
ASUNTO: Relacionado con Proyecto.

San Luis Potosí, S.L.P.

M.C. JUAN MANUEL LÓPEZ QUIJANO  
INVESTIGADOR PRINCIPAL ADSCRITO AL HOSPITAL  
CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"  
P R E S E N T E

Hago de su conocimiento que una vez analizada su propuesta por parte del Comité de Ética e Investigación en la cual solicitó una enmienda a su Proyecto Titulado: **"Factores Clínicos, Genéticos y Nutricionales asociados al Nivel Plasmático de Warfarina y su Metabolito Hidroxilado en Pacientes con Anticoagulación Crónica"**, con Número de Registro: SLP/09-2021. El Comité antes citado aprobó la enmienda, por no afectar al objetivo planteado y a la Metodología que fue establecida desde un principio en su Proyecto de Investigación.

Reciba un cordial saludo.



@EV

"2022, AÑO DE LAS Y LOS MIGRANTES DE SAN LUIS POTOSÍ"

Post. Cruzam de Guadalupe 5550, Col. Lomas de la Virgen, San Luis Potosí S.L.P., C.P. 23800. Tel: (444) 4341100, Fax: 21363

sig@slp.gob.mx/ceind

## ANEXO V. CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO

### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

#### PACIENTE ADULTO

<b>PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN</b>
<b>“Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica”</b>

<b>FECHA DE LA PRESENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	
<b>N.º DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE</b>	

Este protocolo de investigación es realizado en colaboración con la Facultad de Ciencias Químicas y la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Usted es un paciente que cumple con los requisitos para ser incluido en este estudio, por lo que le invitamos a que participe. A continuación, se describe cual es el objetivo del protocolo de investigación, en qué consistirá su participación y cuáles serán los riesgos y los beneficios de su participación; por lo que le pediremos que lea cuidadosamente la información para que pueda tomar una decisión.

#### **INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE.**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte en la población mexicana representado el 20% de los decesos anuales. La terapia anticoagulante ha representado una de las principales alternativas farmacológicas en el manejo de estas enfermedades mejorando el pronóstico de los pacientes, donde la warfarina se ubica como uno de los principales medicamentos que cumplen esta función.

La optimización de la terapia farmacológica con warfarina involucra un gran reto clínico debido a la gran variedad de factores que modifican la respuesta al fármaco generando una gran variabilidad interindividual. La presencia de factores como la edad, la dieta, las interacciones farmacológicas, las concentraciones plasmáticas de warfarina 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 provocando la aparición de eventos adversos o el fracaso terapéutico. El periodo de tiempo que transcurre mientras se efectúa un adecuado ajuste de dosis en el paciente, este 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 evaluar de manera integral el peso que dichos factores poseen sobre los valores del INR, permitiendo diseñar una estrategia que permita ubicar al paciente dentro del rango terapéutico de una manera más rápida y efectiva.

A continuación, se describe el objetivo, los procedimientos, posibles riesgos y beneficios de participar en este estudio con la finalidad de que Usted pueda tomar la decisión de participar o no en la presente investigación, de manera libre e informada.

## **PROCEDIMIENTOS A LOS QUE SE SOMETERÁ AL PACIENTE**

Usted ha sido invitado a participar en este estudio de investigación debido a que ha sido diagnosticado con fibrilación auricular o una enfermedad valvular y ha estado bajo tratamiento con warfarina por al menos 6 meses.

Su participación en este estudio de investigación es completamente voluntaria y si usted acepta participar, le pediremos que lea cuidadosamente el presente documento de consentimiento informado y que haga todas las preguntas necesarias al **Dr. Juan Manuel López Quijano** o al **Q.F.B. Omar Rodríguez Pérez** para que puedan resolver sus dudas.

A continuación, se le pedirá que firme su aceptación a participar al final de este documento, y se le pedirá nos proporcione información general como su nombre, datos personales, edad, peso, estatura, antecedentes médicos (p.ej., hipertensión, diabetes, artritis, etc.), consumo de alcohol, tabaquismo u otros; en una entrevista que realizará el **Q.F.B. Omar Rodríguez Pérez**.

Como parte del estudio, le solicitaremos su autorización para revisar su expediente clínico y obtener algunos datos como los resultados de los análisis clínicos que le han realizado (glucosa, urea, creatinina, colesterol, albúmina, triglicéridos, INR, PT, TPT, etc.), que le ayudarán a los investigadores entender mejor los resultados que se obtengan de este estudio. Para mantener sus datos anónimos, se le asignará un código con el que únicamente los investigadores que participan en este estudio podrán saber su identidad.

También le pediremos nos autorice para que el **Q.F.B Omar Rodríguez Pérez** obtenga 3 muestras de su sangre (3 mL cada una), que equivalen aproximadamente a media cucharadita, de las que se usan para el café. las muestras se obtendrán mediante la punción de la vena de su antebrazo con una jeringa estéril la cual se colocará directamente un tubo especial para la recolección de sangre. Como parte y complemento de este estudio se le aplicara un cuestionario de frecuencia de consumo para evaluar la cantidad aproximada que ingiere de alimentos ricos en vitamina K.

## **RIESGOS ESPERADOS PARA EL PACIENTE**

Los riesgos potenciales implicados por su participación en este estudio son mínimos. En la muestra sanguínea usted podrá presentar los riesgos físicos normales de una venopunción. Como son: dolor al momento de la punción, sensación leve de ardor, moretón, irritación o enrojecimiento en el sitio de la punción.

Asimismo, es importante mencionar que existe una baja posibilidad que la punción sanguínea pueda producir flebitis (inflamación de la vena de la que se obtiene la sangre) o trombosis (que se forme un pequeño coagulo en la vena en la que se realizó la punción). Ambas complicaciones, aunque son muy poco frecuentes pueden llegar a presentarse, pero los

investigadores responsables de este estudio estarán en todo momento al pendiente de cualquier situación y le darán la atención necesaria para resolver la complicación en el caso de que llegará a presentarse, como resultado de cualquiera de las 4 muestras de sangre que usted donará. Si usted llegara a detectar una molestia permanente después de 3 días posteriores a la toma de muestra como enrojecimiento, hinchazón y/o dolor en la zona en la que se realizó la punción (antebrazo), deberá comunicárselo inmediatamente al **Dr. Juan Manuel López Quijano** o a la **Dra. Susanna Edith Medellín Garibay**, para que le den el tratamiento y/o seguimiento pertinente.

- Ninguno de estos tratamientos, ni su participación en este estudio de investigación le generará algún costo.
- El material utilizado para la toma de muestra sanguínea será nuevo, estéril y desechable.
- Es importante que le comentemos que usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio y se le entregará una copia del presente documento de consentimiento informado firmada por los investigadores responsables.

## **BENEFICIOS PARA EL PACIENTE**

Su participación en este estudio no implica que usted recibirá un beneficio directo e inmediato. Al participar en esta investigación podrá conocer las concentraciones de Warfarina y su metabolito hidroxilado en su sangre, así como el genotipo del polimorfismo 1639 de la VKORC1. La información le será de utilidad a su médico tratante para que pueda realizar un mejor seguimiento de su tratamiento.

## **BENEFICIO PARA LA SOCIEDAD**

La elaboración de este estudio beneficiará la optimización del tratamiento con warfarina en pacientes anticoagulados. Es decir, que ayudará a que en un futuro el tratamiento con esta combinación de antibióticos se ajuste de mejor manera en base a las características de cada paciente.

## **PARTICIPACIÓN O RETIRO:**

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y usted ha sido invitado a participar debido a que se encuentra bajo tratamiento con warfarina que le ha indicado su médico tratante de acuerdo con el diagnóstico de su enfermedad.

Usted está en la libertad de negarse a participar en este estudio de investigación; pero si decide participar, en cualquier momento, usted puede revocar o anular el consentimiento que ahora firma. Si decide terminar su participación en este estudio, deberá comunicarlo a la **Dr. Juan Manuel López Quijano** o a la **Dra. Susanna Edith Medellín Garibay** quienes le proporcionarán un documento muy sencillo en el que usted pondrá algunos de sus datos e indicará que ya no desea participar en el estudio. Su decisión de participar o no, no afectará de ninguna forma el trato médico que reciba en la institución para su enfermedad. Se le entregará una copia de este consentimiento informado, donde se incluyen los datos de los responsables de este estudio y del Comité de Ética en Investigación.

## **GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD**

La información personal y médica que usted proporcione para en este estudio será de carácter estrictamente confidencial y será utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntará con la de otros participantes para realizar el presente estudio. Con la finalidad de mantener el anonimato, se le asignará un código para el uso de sus datos. Si usted así lo decide, los investigadores responsables de este estudio le podrán informar a su médico tratante que usted ha aceptado participar en este estudio, para que la información que se obtenga sea incluida en su expediente clínico. Con esta finalidad, le pediremos que indique al final de este documento si está o no de acuerdo en lo anterior.

Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos en revistas especiales dirigidas al personal médico, de enfermería químicos e investigadores relacionados con el área de la salud con la finalidad de que conozcan cómo la Warfarina se comporta en el organismo y las concentraciones plasmáticas obtenidas, para ayudar a ajustar la dosis que se le indica como tratamiento a las pacientes para disminuir la posibilidad de que se presentes efectos no deseados o falle el tratamiento. También los resultados de este estudio podrán ser presentados en reuniones científicas en las que se discuten los nuevos hallazgos que se han obtenido de este y otros estudios relacionados con la salud y el tratamiento de pacientes con su mismo diagnóstico. Los datos clínicos de todos los participantes se presentarán de forma anónima y de tal manera que usted o cualquiera de los pacientes que participen en este estudio no podrán ser identificados.

De acuerdo a la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados y a Ley de Protección de Datos Personales del estado de San Luis Potosí, sus datos personales no podrán tratarse transferirse o utilizarse para fines no descritos expresamente en este documento, a menos que sea estrictamente necesario para el ejercicio y cumplimiento de las atribuciones y obligaciones expresamente previstas en las normas que regulan la actuación de los investigadores responsables del estudio; se dé cumplimiento a un mandato legal; sea necesarios por razones de seguridad pública, orden público, salud pública o salvaguarda de derechos de terceros.

Cualquier otro uso que se requiera para sus datos, análisis clínicos o manejo de sus muestras y/o resultados de los análisis en el laboratorio de investigación que se describen en este documento, deberá ser informado y solicitado con la debida justificación al Comité de Ética en Investigación de este Hospital, quien determinará la pertinencia de la solicitud y en su caso, autorizará un uso diferente para sus datos, muestras y/o productos derivados de sus muestras y/o resultados. Siempre en apego a los lineamientos y normas legislativos nacionales e internacionales y en beneficio y protección de la integridad de los actores participantes.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este estudio se considera de bajo riesgo debido a que únicamente se le solicitarán 3 muestras sanguíneas de 3 mL cada una. Dos muestras serán tomadas inmediatamente tras aceptar su participación en el estudio y una muestra más será tomada en un periodo de tiempo no mayor a 30 días cuando acuda a su cita de seguimiento rutinario. Se le entregará una copia de este consentimiento informado, firmada por el investigador responsable donde se incluyen sus datos de contacto y los datos del Comité de Ética en Investigación de este hospital para aclarar cualquier duda que pudiese surgir.

## **fPROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS AL FINALIZAR EL ESTUDIO**

Las muestras de sangre y los derivados que usted autorizó para su uso en el desarrollo del presente estudio de investigación serán desechados inmediatamente una vez concluidos todos los análisis de acuerdo con la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la Protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo y ya no podrán ser utilizadas para otro fin. Sus muestras serán utilizadas únicamente para los fines que el presente trabajo ha especificado y que le han explicado, y que el Comité de Ética en Investigación revisó y autorizó.

Los investigadores, médicos tratantes, estudiantes o cualquier otra persona relacionada con este proyecto no podrán comercializar, donar o intercambiar alguna de las muestras que usted ha consentido en donar para los propósitos descritos en este documento.

## **COMPROMISO DE RESPUESTA A PREGUNTAS Y DUDAS**

Para realizar cualquier pregunta, duda o aclaración sobre este estudio, o sobre alguna reacción adversa relacionada con el medicamento que usted está tomando como tratamiento y que le ha sido indicado por su médico tratante, usted puede comunicarse con:

### **Dra. Susanna Edith Medellín Garibay**

Laboratorio de Biofarmacia  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.  
Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria,  
C.P. 78210.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
Cedula Profesional: 8900474  
Tel. 8-26-24-40 ext. 6417

### **Dra. Úrsula Fabiola Medina Moreno**

Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina, UASLP  
Av. Venustiano Carranza 2395,  
Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.,  
C.P. 78290  
Cedula Profesional:  
Tel.

### **Q.F.B. Omar Rodríguez Pérez**

Laboratorio de Biofarmacia  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.  
Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria,  
C.P. 78210.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
Cédula Profesional: 12187088  
Cel. 444-105-8438

### **Dr. Juan Manuel López Quijano**

Departamento de Cardiología  
H. Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"  
Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria,  
C.P. 78210.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
Cédula Profesional:  
Tel.

### **Dr. Antonio Gordillo Moscoso**

Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina, UASLP  
Av. Venustiano Carranza 2395,  
Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.,  
C.P. 78290  
Cedula Profesional:  
Tel.

### **Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia**

Laboratorio de Biofarmacia  
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.  
Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria,  
C.P. 78210.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
Cedula Profesional: 1581802  
Tel. 8-26-24-40 ext. 6571

### **Autorización para el acceso al expediente clínico del paciente y uso de datos clínicos**

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que los investigadores responsables de este proyecto puedan revisar su expediente clínico y utilizar los datos clínicos que se encuentran descritos en el mismo, de manera anónima para este protocolo de investigación, cuyos objetivos y procedimientos se le han explicado. Marque con una X su respuesta:

Sí, doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

No doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

### **Autorización para el uso de mis datos personales de contacto.**

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que únicamente los investigadores responsables de este estudio de investigación puedan utilizar los datos personales de contacto como teléfono fijo, teléfono móvil, correo electrónico o redes sociales que usted ha indicado, para poder localizarme de ser necesario para una posible cita y/o entrevista o participación en un seguimiento de mi enfermedad y/o tratamiento. Marque con una X su respuesta:

Sí, doy mi autorización a los investigadores que me localicen utilizando mis datos de contacto para un posible seguimiento de mi enfermedad o tratamiento, como me han explicado.

No doy mi autorización a los investigadores que me localicen utilizando mis datos de contacto para un posible seguimiento de mi enfermedad o tratamiento, como me han explicado.

### **Autorización para informar a mi médico tratante de mi participación en este estudio y para que mis resultados sean incluidos en mi expediente clínico.**

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que los investigadores responsables de este estudio de investigación le informen a mi médico tratante, el Dr. (a) \_\_\_\_\_, que he aceptado participar en este estudio de Monitorización de Warfarina con el número de registro \_\_\_\_\_ ante el CEI de este hospital y para que los resultados obtenidos con las muestras de sangre que he consentido en proporcionar sean incluidos en mi expediente clínico para que puedan ser utilizados como referencia para mi tratamiento con Warfarina por mi médico tratante. Marque con una X su respuesta:

Sí, doy mi autorización a los investigadores para que informen a mi médico tratante de mi participación en este estudio de investigación de la farmacocinética del tamoxifeno y para que se incluyan mis resultados en mi expediente, de acuerdo con lo anterior mencionado y como me han explicado.

No doy mi autorización a los investigadores para que informen a mi médico tratante de mi participación en este estudio de investigación de la farmacocinética del tamoxifeno y para que se incluyan mis resultados en mi expediente, de acuerdo con lo anterior mencionado y como me han explicado.

Por medio del presente documento de consentimiento informado acepto participar en el estudio de investigación denominado "Determinación de los factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados a la variabilidad del INR y su asociación con las concentraciones plasmáticas de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes anticoagulados", de manera libre y voluntaria.

## **Aceptación del documento de Consentimiento Informado para el estudio de Farmacocinética**

Si usted desea consentir su participación en esta investigación, por favor firme y feche este documento en los espacios proporcionados en la parte inferior y ponga sus iniciales en cada página. Su firma significa que usted acepta lo siguiente:

1. Se me ha dado información completa y adecuada en forma verbal y por escrito sobre el objetivo del estudio de este protocolo de investigación, sus beneficios y riesgos implicados.
2. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento y terminar mi participación en el estudio Farmacocinético en cualquier momento sin afectar mi derecho a recibir atención médica.
3. Es mi responsabilidad preguntar para aclarar cualquier punto que no entienda claramente en relación con mi participación en este estudio. He hecho todas las preguntas a la persona que realiza el proceso de consentimiento y he recibido respuestas satisfactorias.
4. No he ocultado o distorsionado cualquier condición médica actual o cualquier antecedente médico que pudiera perjudicar o afectar mi salud. He respondido todas las preguntas con relación a mi salud en forma precisa y verdadera.
5. Tengo 18 años o más y soy legalmente capaz de dar este consentimiento.
6. Acepto participar en el estudio titulado **“Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica”** de manera voluntaria sin que me hayan presionado, manipulado y/u obligado. Entiendo que mi negación a participar o la discontinuación de mi participación en cualquier momento, no implicará penalidad o pérdida de beneficios a los que de otra forma tengo derecho.
7. Entiendo y estoy de acuerdo en que la información obtenida a partir del presente estudio puede ser utilizada para la publicación de estos resultados como parte de la divulgación científica y como apoyo a la práctica clínica, pero que en todo momento se utilizara un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de mis datos.
8. Me han explicado que la información personal y clínica que he consentido en proporcionar conservará mi privacidad y que se utilizará solo para los fines que deriven de este estudio. Los datos relacionados con mi privacidad personal y/o familiar serán manejados en forma confidencial ya que se utilizará un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de todos los datos y resultados.
9. Los investigadores que participan en este proyecto se han comprometido a proporcionarme la información actualizada que pueda ser importante para mi salud y que se obtenga durante el estudio en el momento en el que lo solicite y me entregarán una copia firmada de este documento de consentimiento informado.

Por medio del presente documento de consentimiento informado acepto participar en el estudio de investigación denominado **“Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica”**, de manera libre y voluntaria.

<b>NOMBRE DEL PACIENTE</b>	<b>FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL PACIENTE</b>
<b>FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO</b>	

<b>NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL (si es necesario)</b>	<b>FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL REPRESENTANTE LEGAL</b>

<b>FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO</b>	<b>PARENTESCO</b>
<b>DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 1</b>	

<b>NOMBRE DEL TESTIGO 1</b>	<b>FIRMA DEL TESTIGO 1</b>
<b>FECHA</b>	<b>PARENTESCO</b>
<b>DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 1</b>	

\_\_\_\_\_  
**Q.F.B. Omar Rodríguez Pérez**  
**Cédula Profesional: 12187088**

<b>Dra. Susanna Edith Medellín Garibay</b> <b>Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética</b> <b>Facultad de Ciencias Químicas UASLP</b> <b>CÉDULA PROFESIONAL 8900474</b>	<b>Dr. Juan Manuel López Quijano</b> <b>Departamento de Cardiología</b> <b>Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”</b> <b>CÉDULA PROFESIONAL 2720842</b>

## ANEXO VI. HOJA RECOLECCIÓN DE DATOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
HOJA DE CONTROL

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

No. Registro interno \_\_\_\_\_

Institución Médica: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: F  M

Médico tratante: \_\_\_\_\_

Peso (kg): \_\_\_\_\_ Estatura (m): \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_ Fecha diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Enfermedades concomitantes:

( ) HTA      ( ) Insuficiencia Renal      ( ) Dislipidemias      ( ) EPOC

( ) Diabetes      ( ) Insuficiencia Cardíaca      ( ) Insuficiencia Hepática      ( ) Cirrosis

Antecedentes Infarto/ECV: No ( ) Si ( ) \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

Presión arterial: Sistólica \_\_\_\_\_ mmHg Diastólica \_\_\_\_\_ mmHg

Alcoholismo ( )      Tabaquismo ( )

### Evaluación Inicial

Dosis Warfarina: \_\_\_\_\_ INR: \_\_\_\_\_ Vitamina K (ug/día): \_\_\_\_\_ Alb(mg/dL) \_\_\_\_\_

Cp Warfarina (ug/mL): \_\_\_\_\_ Cp 7-OH Warfarina (ug/mL): \_\_\_\_\_

Polimorfismo VKCOR1= GG(Normal) ( ) GA/AA(Sensible): ( )

### Registro esquema de medicación

Medicamento/Principio activo(s)	Dosis	Régimen Posológico	Fecha de inicio / Prescripción

### Seguimiento del paciente

Dosis Warfarina: \_\_\_\_\_ INR: \_\_\_\_\_

Cp Warfarina (ug/mL): \_\_\_\_\_ Cp 7-OH Warfarina (ug/mL): \_\_\_\_\_

### Datos de laboratorio (Adicionales):

Hemoglobina: \_\_\_\_\_ g/dL                      TP: \_\_\_\_\_ segundos

Creatinina: \_\_\_\_\_ mg/dL                      TPT: \_\_\_\_\_ segundos

CLcr: \_\_\_\_\_ mL/min/1.73 m<sup>3</sup>

### Notas médicas:

Dr.	Fecha:
Dr.	Fecha:

## ANEXO VII. CARTAS DE APROBACION COMITES DE ÉTICA

### A. COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"



HOSPITAL CENTRAL  
"DR. IGNACIO  
MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 14 de septiembre de 2021

**Dr. Juan Manuel López Quijano**  
Investigador principal  
PRESENTE.

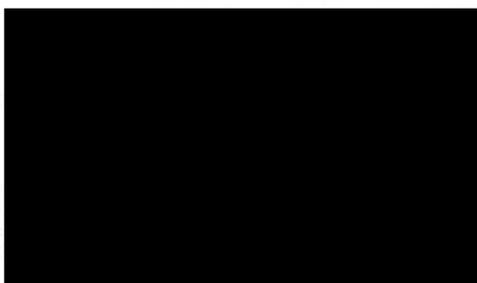
Estimado Investigador:

Por este conducto se le comunica que el protocolo de investigación titulado: "**Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica**", fue evaluado por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución, con registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427. El dictamen para este protocolo fue el siguiente:

#### APROBADO

El Comité de Ética en Investigación autoriza la vigencia de ejecución de este protocolo por 365 días naturales a partir de la fecha de emisión de este oficio de dictamen.

El investigador principal deberá comunicar a este Comité la fecha de inicio y término del proyecto, y presentar el informe final correspondiente. Asimismo, el Comité de Ética e Investigación podrá solicitar información al investigador principal referente al avance del protocolo en el momento que considere pertinente



Hospital Central  
Dr. Ignacio Morones Prieto

14 SET. 2021



COMITE DE ETICA  
INVESTIGACION  
SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

c.c.p. Archivo, Subdirección de Educación e Investigación, Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Av. Venustiano Carranza No. 2395  
Zona Universitaria  
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290  
Tel. 01 (444) 198-10-00  
www.hospitalcentral.gob.mx  
www.slp.gob.mx

San Luis Potosí, S.L.P., a 14 de septiembre de 2021

**Dr. Juan Manuel López Quijano**  
**Investigador principal**  
**PRESENTE.-**

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado "**Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica**", fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

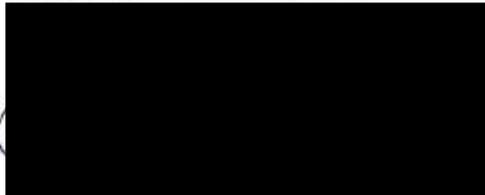
**APROBADO**

El número de registro es **72-21**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

La vigencia de ejecución de este protocolo es por 1 año a partir de la fecha de emisión de este oficio, de igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe técnico final.

\*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente



C.C.P. Archivo

San Luis Potosí, S.L.P., a 26 de agosto 2021

**Dr. Juan Manuel López Quijano**  
Presente.-

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado:

**Factores clínicos, genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica**

fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093 y fue dictaminado como:

**APROBADO**

De acuerdo a los estatutos por parte del comité de investigación y ética de nuestro hospital, después de la evaluación por pares miembros de dichos comités. Por lo que se dará seguimiento a cada etapa del desarrollo del proyecto de investigación hasta su difusión de los resultados.

Atentamente

26 AGO. 2021

INVESTIGACION

Archivo

## B. COMITÉ ESTATAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD



**POTOSÍ**  
PARA LOS POTOSINOS  
GOBIERNO DEL ESTADO DE POTOSÍ

**SALUD**  
SERVICIOS DE SALUD

DG/DAM/SCES/ 32113/2021

6 de diciembre del 2021  
Código: 16S.1

ASUNTO: Evaluación de Protocolo Registro Estatal SLP/09-2021.

DRA. MARIBEL MARTÍNEZ DÍAZ  
ENCARGADA DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
P R E S E N T E.

Hago de su conocimiento que el pasado 23 de noviembre del 2021, en Sesión Ordinaria del Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud, se realizó la Evaluación del Protocolo de Investigación:

Factores clínicos y genéticos y nutricionales asociados al nivel plasmático de warfarina y su metabolito hidroxilado en pacientes con anticoagulación crónica	Dr. Juan Manuel López Quijano
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí	
REGISTRO ESTATAL	
SLP/09-2021	

Siendo el dictamen por consenso:

### OPINIÓN TÉCNICA FAVORABLE

Lo anterior, con fundamento en el TÍTULO QUINTO de la Ley Estatal de Salud, que establece las bases, condiciones y normatividad en materia de Investigación para la Salud, y la NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de Proyectos de Investigación para la Salud en Seres Humanos.

En base a la Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación, el Comité tendrá la facultad de solicitar el seguimiento del estudio en cualquier fase de su desarrollo, su cumplimiento de acuerdo al Protocolo autorizado y a la Guía de buena Práctica Clínica, para garantizar la protección del sujeto participante al estudio, y cumplir con las disposiciones que marca el Reglamento Interno del Comité Estatal de Ética en Investigación, Capítulo X, Artículo No. 45, el Investigador Titular se obliga como parte de los compromisos adquiridos, a entregar con periodicidad semestral los avances de la Investigación al Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud.

Reciba un cordial saludo.

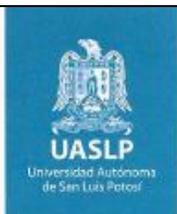
DIRECTOR



2021, "Año de la Solidaridad médica, administrativa, y civil, que colabora en la contingencia sanitaria del COVID 19"

FOO3, Calzada de Guadalupe 9820, Col. Unión de la Virgen, San Luis Potosí S.L.P., C.P. 76500 Tel: (544) 23411 00, Ext. 21312 slp.gob.mx/salud

## C. COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



*Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas*  
*Registro Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726*

17 de noviembre de 2021

**DRA. SUSANNA EDITH MEDELLÍN GARIBAY**  
**PROFESORA INVESTIGADORA.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.**  
**PRESENTE.**

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo titulado "FACTORES CLÍNICOS, GENÉTICOS Y NUTRICIONALES ASOCIADOS AL NIVEL PLASMÁTICO DE WARFARINA Y SU METABOLITO HIDROXILADO EN PACIENTES CON ANTICOAGULACIÓN CRÓNICA", aprobado por el Comité de Ética y por el Comité de Investigación Científica del Hospital General "Dr. Ignacio Morones Prieto" con registro 72-21, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 17 de noviembre del año en curso por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

**APROBADO**

Su protocolo tiene la clave **CEID2021-014-S**

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el **Art. 13**, en particular al apartado **13.2.2**:

"El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un informe anual que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe".

**ATENTAMENTE**

[www.uaslp.mx](http://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

Ccp. Archivo



## ANEXO VIII. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

Resultados obtenidos de selectividad del método en plasma, el efecto del anticoagulante (Heparina y EDTA), el tipo de muestra (hemolizada y lipémica) y el efecto acarreo.

Tabla 1. Selectividad del método

<b>Warfarina</b>			
<b>Muestras blanco de matriz biológica</b>	<b>Área bajo la curva (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>	<b>%ABC del LIC</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
1	10025	16.6	%ABC < 20% ABC LIC
2	6318	10.5	
3	2926	4.8	
4	6394	10.6	
5	2950	4.9	
6	2437	4.0	
<b>7-OH Warfarina</b>			
1	4830	17.49	%ABC < 20% ABC LIC
2	1549	5.61	
3	1998	7.23	
4	1087	3.94	
5	441	1.60	
6	685	2.48	
<b>Metronidazol (EI)</b>			
1	18640	0.82	%ABC < 20% ABC LIC
2	39500	1.75	
3	40212	1.78	
4	10142	0.45	
5	12741	0.56	
6	11353	0.50	

Tabla 2. Selectividad del método. Muestra hemolizada y lipémica

<b>Warfarina</b>			
<b>Muestras blanco de matriz biológica</b>	<b>Área bajo la curva (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>	<b>%ABC del LIC</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>Hemolizada</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	855	1.42	
2	3230	5.35	
3	557	0.92	
<b>Lipémica</b>			
1	1111	1.84	
2	290	0.48	
3	832	1.38	
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>Hemolizada</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	3991	14.45	
2	2241	8.11	
3	2732	9.89	
<b>Lipémica</b>			
1	2975	10.77	
2	4024	14.57	
3	2794	10.12	
<b>Metronidazol (EI)</b>			
<b>Hemolizada</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	13720	0.61	
2	15608	0.69	
3	12294	0.54	
<b>Lipémica</b>			
1	31058	1.37	
2	30985	1.37	
3	31494	1.39	

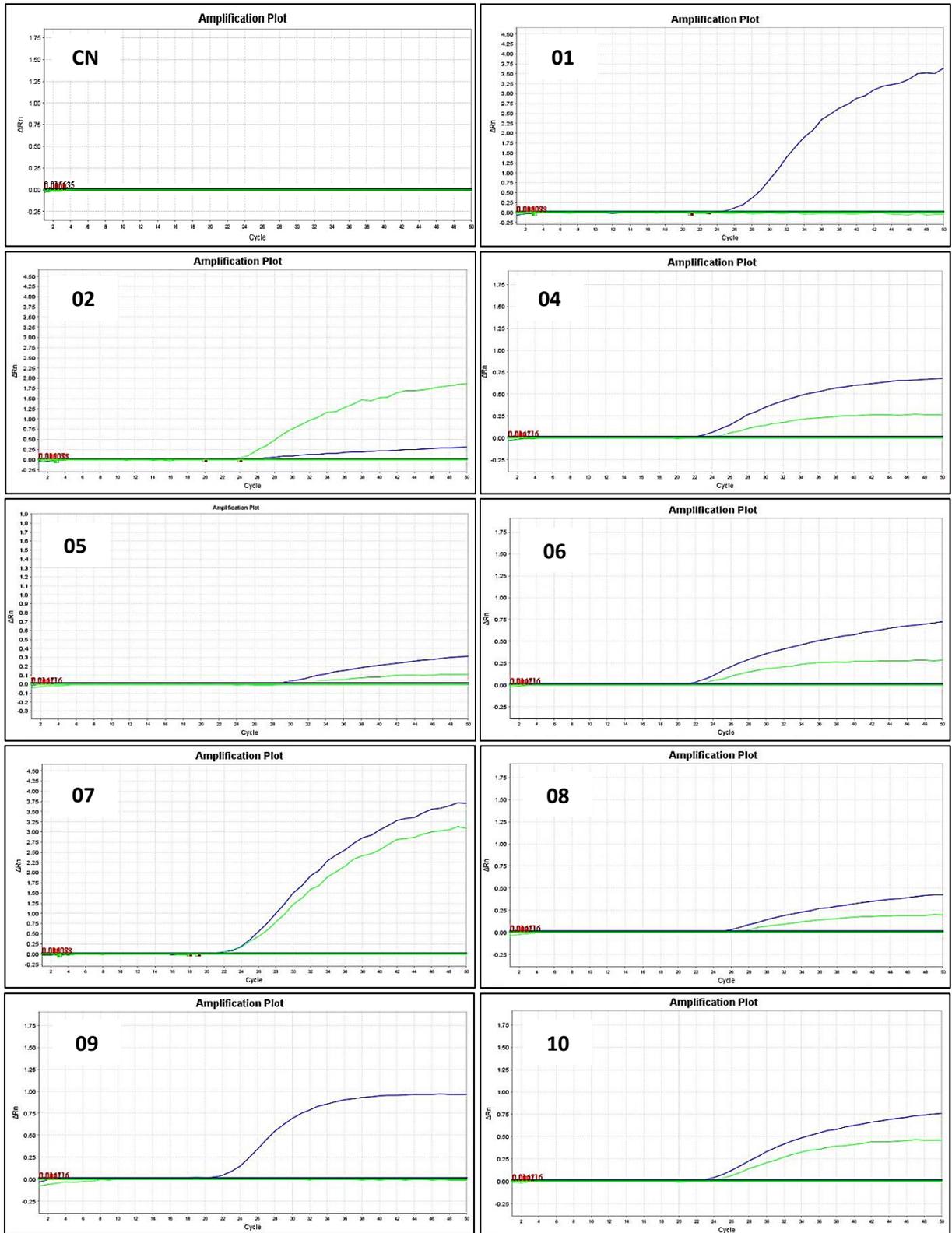
Tabla 3. Selectividad del método. Efecto del anticoagulante

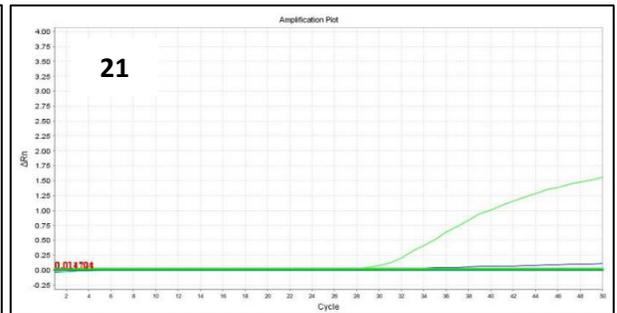
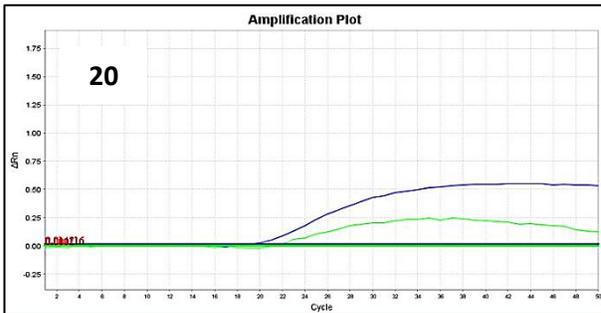
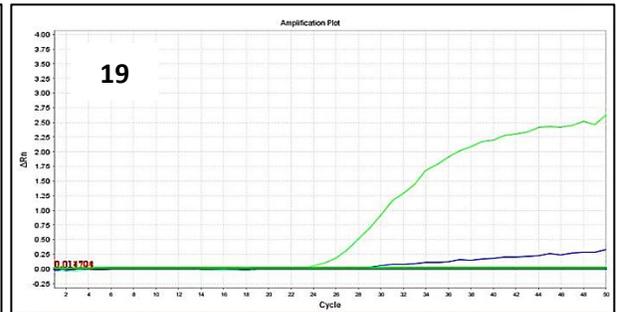
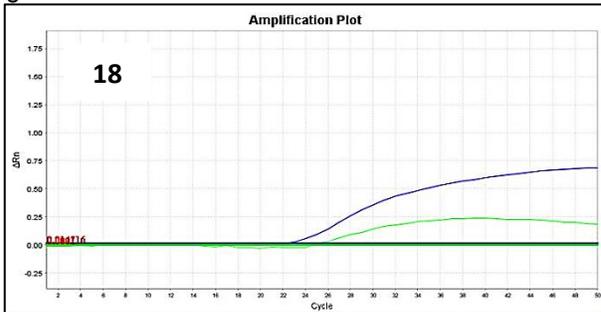
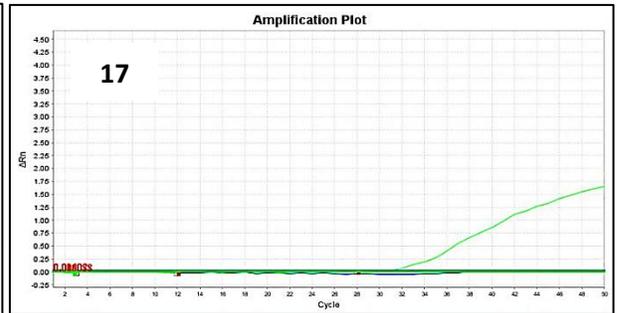
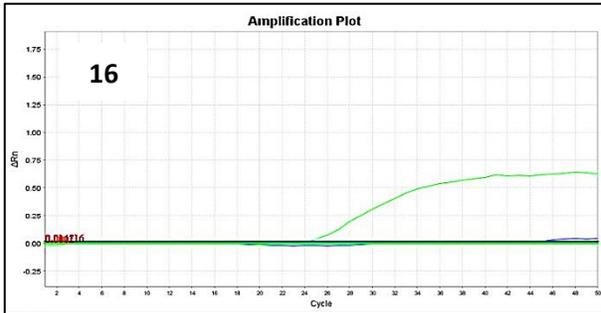
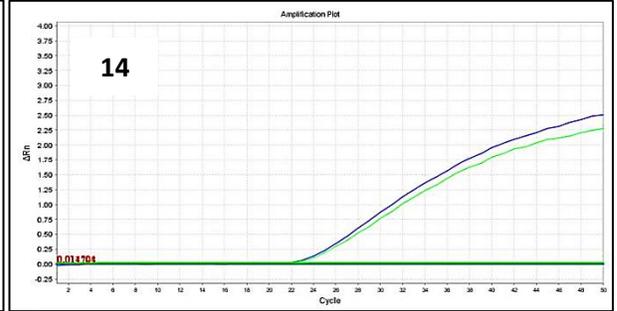
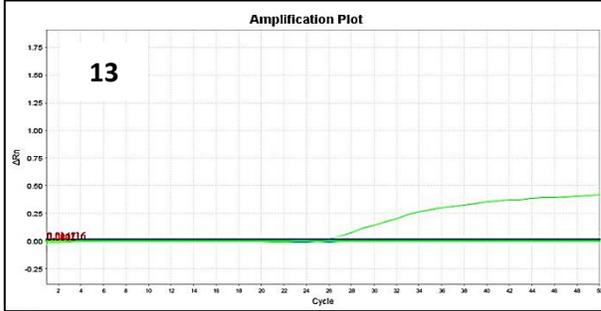
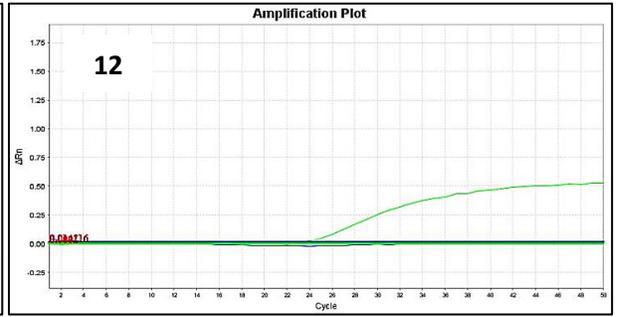
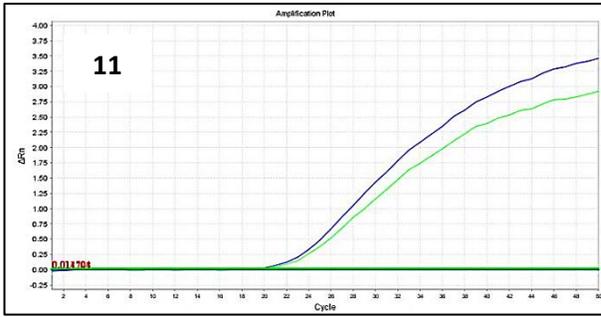
<b>Warfarina</b>			
<b>Muestras blanco de matriz biológica</b>	<b>Área bajo la curva (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>	<b>%ABC del LIC</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>Heparina</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	2542	4.21	
2	2487	4.12	
3	1978	3.27	
<b>EDTA</b>			
1	6409	10.61	
2	6204	10.27	
3	2274	3.76	
<b>7-OH Warfarina</b>			
<b>Heparina</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	2351	8.51	
2	1637	5.93	
3	2567	9.29	
<b>EDTA</b>			
1	1415	5.12	
2	2120	7.68	
3	1033	3.74	
<b>Metronidazol (EI)</b>			
<b>Heparina</b>			%ABC < 20% ABC LIC
1	13211	0.58	
2	15675	0.69	
3	10567	0.47	
<b>EDTA</b>			
1	6116	0.27	
2	11647	0.52	
3	14568	0.64	

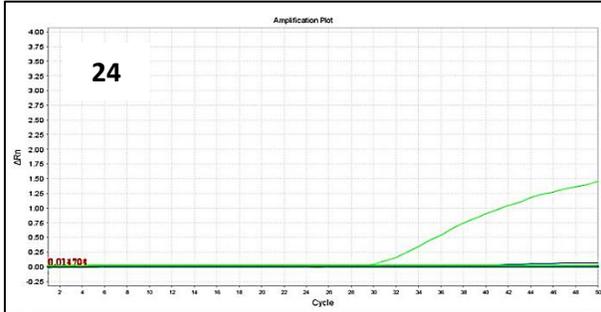
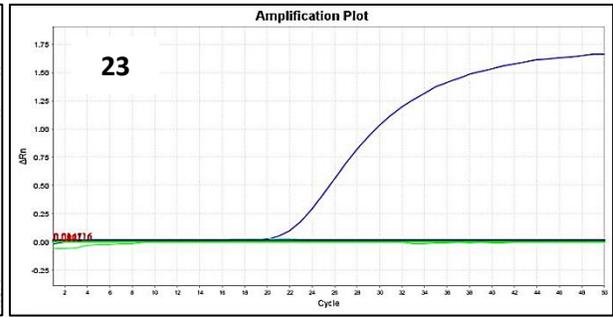
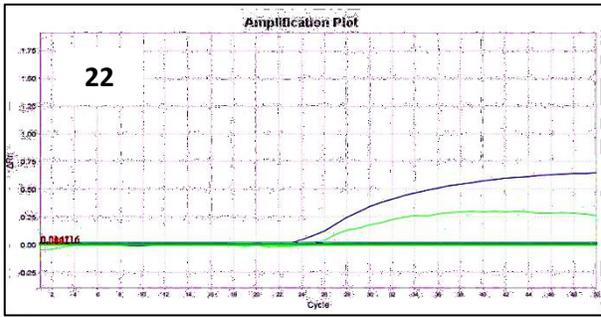
Tabla 4. Efecto acarreo

Muestras blanco de matriz biológica	Área bajo la curva ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	%ABC del LIC	Criterio de aceptación
<b>Warfarina</b>			
1	2568	4.25	%ABC < 20% ABC LIC
2	2361	3.91	
3	6979	11.55	
<b>7-OH Warfarina</b>			
1	2903	10.51	%ABC < 20% ABC LIC
2	3769	13.65	
3	5101	18.47	
<b>Metronidazol</b>			
1	38831	1.72	%ABC < 20% ABC LIC
2	37992	1.68	
3	9872	0.44	

## ANEXO IX. GRÁFICOS DE AMPLIFICACIÓN ( $\Delta Rn$ VS CICLOS).







## 12. 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).