

FUNCIÓN RENAL Y NIVEL PLASMÁTICO DE DABIGATRÁN EN EL VALLE, MEDIDO POR UN ENSAYO DE TROMBINA DILUIDA

MARTA E. MARTINUZZO^{1,2}, CRISTINA DUBOSCOQ³, ESTELA S. VIÑUALES^{2,4}, BEATRIZ GIRARDI⁴,
DIANA PENCHASKY^{2,4}, JOSÉ CERESSETTO³, GERMÁN STEMMELIN³, VICTORIA OTERO⁴,
LUIS H. BARRERA^{1,2}, MARINA S. LÓPEZ¹, JUAN C. OTASO^{1,2}, JOSÉ OYHAMBURU^{1,2}

¹Grupo Bioquímico, Laboratorio Central, Hospital Italiano de Buenos Aires, ²Instituto Universitario Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina, ³Servicio de Hematología, Hospital Británico de Buenos Aires, ⁴Servicio de Hematología, Hospital Italiano de Buenos Aires

Resumen El dabigatrán etexilato (inhibidor directo de trombina) es eficaz en la prevención tromboembólica en pacientes con fibrilación auricular. No requiere control rutinario de laboratorio, pero dada su eliminación renal, sería importante medirlo ante el deterioro de la función renal. Los objetivos del trabajo fueron verificar la calidad analítica del ensayo tiempo de trombina diluido para medición de la concentración plasmática (cc) de dabigatrán, correlacionar las cc con las pruebas básicas de coagulación tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y evaluarlas de acuerdo al *clearance* de creatinina (CLCr). Se utilizaron muestras de plasma de 40 pacientes que recibían dabigatrán 150 (n = 19) o 110 (n = 21) mg/12 horas, colectadas 10-14 horas después de la última toma. Los ensayos de trombina diluida *HemosIL DTI* para la medición de dabigatrán, TP y APTT (IL), fueron realizados en coagulómetros fotoópticos ACL TOP 300 y 500 (IL). El DTI presentó coeficiente de variación intraensayo < 5.4% e interensayo < 6.0%, rango de linealidad 0-493 ng/ml; cc medidas en pacientes: mediana 83 (4-945) ng/ml. Individuos con CLCr en tercil inferior (< 46.1 ml/min) presentaron cc significativamente más elevadas, 308 (49-945), que los de terciles medio, 72 (12-190), y superior, 60 (4-118) ng/ml. Las correlaciones cc vs. APTT o TP fueron moderadas, $r^2 = 0.59$, -0.66 , $p < 0.0001$, respectivamente. La prueba ensayada permitió cuantificar el nivel de dabigatrán plasmático tanto en pacientes con función renal normal como deteriorada, representando una herramienta útil en situaciones clínicas como deterioro de la función renal, pre cirugía o emergencias.

Palabras clave: dabigatrán, medición de dabigatrán, insuficiencia renal

Abstract *Renal function and plasma dabigatran level measured at trough by diluted thrombin time assay.* Dabigatran etexilate (direct thrombin inhibitor) is effective in preventing embolic stroke in patients with atrial fibrillation. It does not require laboratory control, but given the high renal elimination, its measurement in plasma is important in renal failure. The objectives of the study were to verify the analytical quality of the diluted thrombin time assay for measurement of dabigatran plasma concentration (cc), correlate cc with classic coagulation assays, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), and evaluate them according to the creatinine clearance (CLCr). Forty plasma samples of patients (34 consecutive and 6 suspected of drug accumulation) receiving dabigatran at 150 (n = 19) or 110 (n = 21) mg/12 hours were collected. Blood samples were drawn at 10-14 hours of the last intake. Dabigatran concentration was determined by diluted thrombin time (*HemosIL DTI*, Instrumentation Laboratory (IL). PT and APTT (IL) were performed on two photooptical coagulometers, ACL TOP 300 and 500 (IL). DTI presented intra-assay coefficient of variation < 5.4% and inter-assay < 6%, linearity range 0-493 ng/ml. Patients' cc: median 83 (4-945) ng/ml. Individuals with CLCr in the lowest tertile (22.6-46.1 ml/min) showed significantly higher median cc: 308 (49-945), compared to the average 72 (12-190) and highest tertile, 60 (4-118) ng/ml. Correlation between cc and APTT or PT were moderate, $r^2 = 0.59$ and -0.66 , $p < 0.0001$, respectively. DTI test allowed us to quantify plasma dabigatran levels, both in patients with normal or altered renal function, representing a useful tool in clinical situations such as renal failure, pre surgery or emergencies.

Key words: dabigatran, plasma dabigatran measurement, renal function

El dabigatrán etexilato es un inhibidor directo de trombina utilizado para la prevención del accidente cerebrovascular embólico en pacientes con fibrilación auricular no valvular^{1,2}, prevención de tromboembolismo venoso en cirugías de reemplazo de cadera y rodilla electivas, y en tratamiento de tromboembolismo venoso^{3,4}. Es una droga que presenta dosis-respuesta previsible por lo que fue lanzada al mercado sin necesidad de monitoreo rutinario del nivel de anticoagulación, aventajando de esta manera a los anticoagulantes antagonistas de la Vitamina K.

El dabigatrán llega a su pico de concentración plasmática a las 2 horas de administrado, y la misma declina de manera biexponencial con una vida media de 11 horas en individuos añosos sanos. Después de múltiples dosis la vida media observada fue de 12-14 horas⁵.

Si bien la droga tiene una farmacodinamia previsible, hay situaciones en las que se considera útil la determinación de su nivel plasmático, como ante un episodio hemorrágico, una evaluación prequirúrgica de urgencia en pacientes que la recibieron recientemente, sobredosis o intoxicación, o en el caso de insuficiencia renal aguda. También es recomendable medirla en casos de pacientes con peso corporal extremadamente bajo, sospecha de embarazo, insuficiencia renal crónica leve y en pacientes que reciben ciertas medicaciones que interactúan con el metabolismo de la glicoproteína P⁶.

El dabigatrán prolonga principalmente el APTT y en menor cuantía los valores de tiempo de protrombina (TP) dependiendo del reactivo/sistema de detección y de las horas transcurridas entre la toma de la droga y la extracción sanguínea. El tiempo de trombina tradicional (TT) es una prueba extremadamente sensible para medir dabigatrán.

La técnica para medir dabigatrán en plasma mundialmente más utilizada en los laboratorios clínicos es el tiempo de trombina diluido (HTI, *Hemoclott Thromb Inhibitor assay*) que fue descrito hace varios años y producido por una única empresa que poseía de manera exclusiva los calibradores y controles respectivos⁷. Esta técnica utiliza una trombina humana concentrada y diluye la muestra 1/8 en plasma normal aportado por el equipo. Más recientemente otros métodos basados en este mismo principio han sido desarrollados por otras empresas, entre ellas el reactivo utilizado en este estudio y que recientemente ha ingresado al país, *HemosIL DTI de Instrumentation Laboratory (IL)*.

Los objetivos del presente estudio fueron: a) verificar la calidad analítica (precisión, exactitud y linealidad) del test *HemosIL DTI* (tiempo de trombina diluido) para la medición de la concentración plasmática de dabigatrán en dos coagulómetros diferentes de detección foto óptica, b) correlacionar los niveles de droga con las pruebas básicas de coagulación TP, APTT y TT; y c) evaluar los niveles de la droga medidos en el valle de acuerdo al *clearance*

de creatinina de pacientes con fibrilación auricular no valvular anticoagulados con dabigatrán.

Materiales y métodos

Se utilizaron 40 muestras de plasma de pacientes (34 consecutivos y 6 con sospecha de acumulación de la droga) que recibían dabigatrán en dosis de 150 mg/12 horas, n = 19, o 110 mg /12 horas, n = 21, para prevención de accidente cerebrovascular embólico por fibrilación auricular no valvular. La edad (mediana) fue 78 (23-89) años, sexo: 23 femenino. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Italiano y los pacientes firmaron consentimiento informado. Las muestras de sangre fueron tomadas en el valle (10- 14 horas de la última toma) en citrato de sodio 3.2%. Las determinaciones de TP, APTT y TT fueron realizadas antes de 4 horas de extraída la muestra. Se congelaron alícuotas de plasma a 80 °C hasta el momento de la determinación de la concentración de dabigatrán.

El TP fue realizado con el reactivo *PT Fibrinogen HS plus* [I L, Bedford MA, USA], el APTT con APTT SP (IL) y el TT con *HemosIL Thrombin Time* (IL) por el método coagulométrico.

Medición de dabigatrán: se realizó la prueba coagulométrica de tiempo de trombina diluido utilizando el reactivo *HemosIL DTI* (IL), que contiene trombina bovina y plasma normal como diluyente. Los calibradores y controles son provistos por el fabricante.

Todas las determinaciones fueron procesadas en los dos centros utilizando coagulómetros fotoópticos ACL TOP 300 y 500 (IL).

Para evaluar la performance analítica del ensayo DTI se siguió el protocolo EP15A2⁸, procesando controles bajo y alto durante 5 jornadas de trabajo por triplicado.

La linealidad se midió a través de diluciones del calibrador más alto, y se verificó tanto diluyendo en buffer como en pool de plasmas normales.

El CLCr se calculó a partir del valor de creatinina sérica a través de la fórmula de Cockcroft-Gault.

Estadística: Se investigó la correlación entre los niveles de dabigatrán y TP (% actividad) o APTT a través regresión no lineal.

La correlación entre los niveles plasmáticos de dabigatrán y peso, edad y CLCr se determinó por el test de correlación de Spearman.

La comparación de los niveles de dabigatrán en plasma en los diferentes terciles de CLCr fue realizado por el test no paramétrico de Kruskal Wallis con análisis post Hoc de Turkey y Bonferroni.

Resultados

La Tabla 1 muestra las características de los pacientes y los niveles de dabigatrán obtenidos en el valle. Se observa que es una población en general añosa y la media de CLCr observada fue cercana a 50 ml/min.

En el desarrollo de la puesta a punto de la técnica para medir dabigatrán en plasma, *HemosIL DTI*, se verificó un comportamiento de calidad analítica aceptable en los dos coagulómetros evaluados, dadas la buena reproducibilidad y exactitud del ensayo (Tabla 2).

También se pudo verificar la linealidad en un rango extenso de cc como puede observarse en la Fig. 1 a y b.

TABLA 1.– Características de la población estudiada

Característica	Mediana	Rango
Edad (años)	78	23-89
Peso (kg)	73	43-116
Creatinina plasmática (mg/dl)	1.05	0.61-2.49
CLCr (ml/min)	54.7	22.6-153.0
cc dabigatrán (ng/ml)	83	4-945

CLCr: Clearance de creatinina, cc:concentración plasmática

TABLA 2.– Características analíticas del ensayo HemosIL DTI

	Control bajo (50 ng/ml)		Control alto (234 ng/ml)	
	ACL TOP300	ACL TOP500	ACL TOP300	ACL TOP500
CV% repetibilidad	2.04	2.03	5.07	5.40
CV% interensayo	4.28	3.10	5.94	5.32
BIAS %	4.0	1.5	5.9	3.9

CV%: coeficiente de variación porcentual, BIAS%: sesgo porcentual con respecto a la media informada por el fabricante, ACL TOP 300 y ACL TOP 500: coagulómetros automáticos fotoópticos.

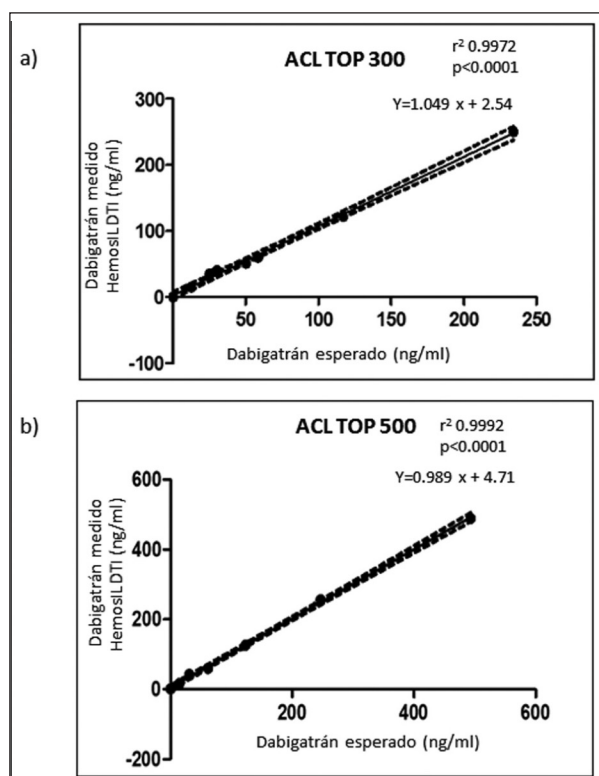


Fig. 1.– Linealidad del ensayo HemosIL DTI en los coagulómetros ACL TOP 300 (a) y 500(b). Se grafican las curvas de regresión lineal entre los valores medidos y los esperados a partir de diluciones del calibrador más elevado (493 ng/ml). Las líneas punteadas muestran el 95%IC de la recta. En cada gráfico se expresa la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación de Pearson.

En muestras de individuos sanos ($n = 10$), que no recibían la droga, el nivel de dabigatrán plasmático medido fue < 10 ng/ml.

Se analizaron los resultados de las pruebas de coagulación clásicas TP (expresado en % de actividad) y APTT con las cc de dabigatrán en pacientes anticoagulados con esta droga, hallándose correlaciones moderadas, con ecuaciones de regresión no lineal de decaimiento en una etapa, negativa y positiva, con r^2 0.66 y 0.59, respectivamente (Fig. 2 a y b). La prueba de tiempo de trombina realizada de rutina utilizando trombina bovina a 3U/ml es demasiado sensible, hallándose resultados > 180 segundos en la mayoría de los pacientes (29/35), (Fig. 2c). Ninguna muestra presentó TT normal y en 10 pacientes el TP fue normal. Entre las muestras evaluadas, las tomadas en el valle y 3 muestras adicionales tomadas a 48 horas de suspendida la droga, hubo 9 con APTT normal que correspondían a concentraciones de dabigatrán medidas entre 10 y 72 ng/ml, siendo en 7 de ellas > 30 ng/ml.

Cuando se analizaron los resultados de dabigatrán plasmático en relación con las características de la población evaluada se observó débiles correlaciones positivas con la edad (Fig. 3a), negativa con el peso (Fig. 3b) y con el índice de masa corporal (Fig. 3c); adicionalmente, se halló una correlación negativa más importante con el CLCr (Fig. 3d), siendo todas estadísticamente significativas.

Al dividir los resultados en terciles de CLCr, se observó que aquellos pacientes con CLCr en el tercil inferior (22.6-46.1 ml/min) presentaban niveles de dabigatrán plasmático en el valle estadísticamente superiores a

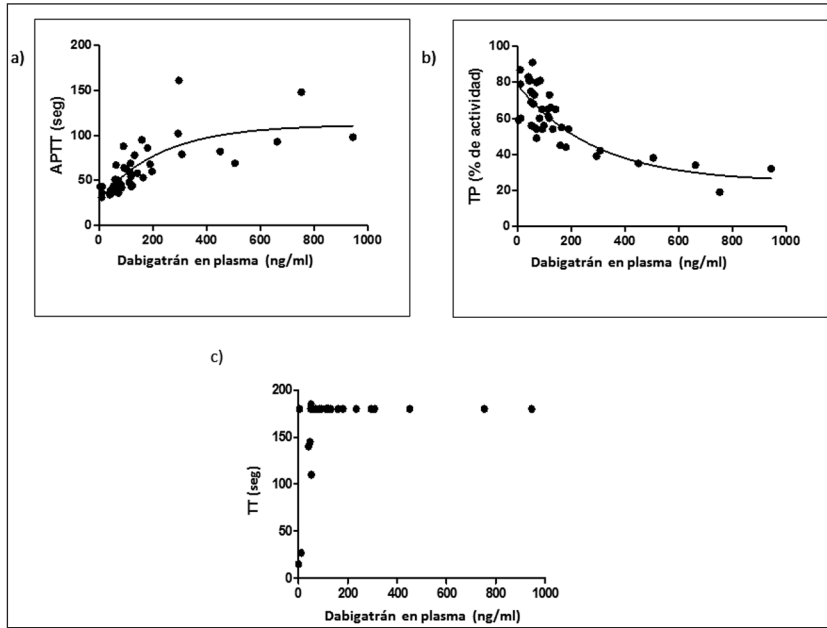


Fig. 2.- Correlaciones de los valores de APTT (a), TP expresado en % de actividad (b) y TT (c) con los niveles plasmáticos de dabigatrán medidos en muestras de pacientes.

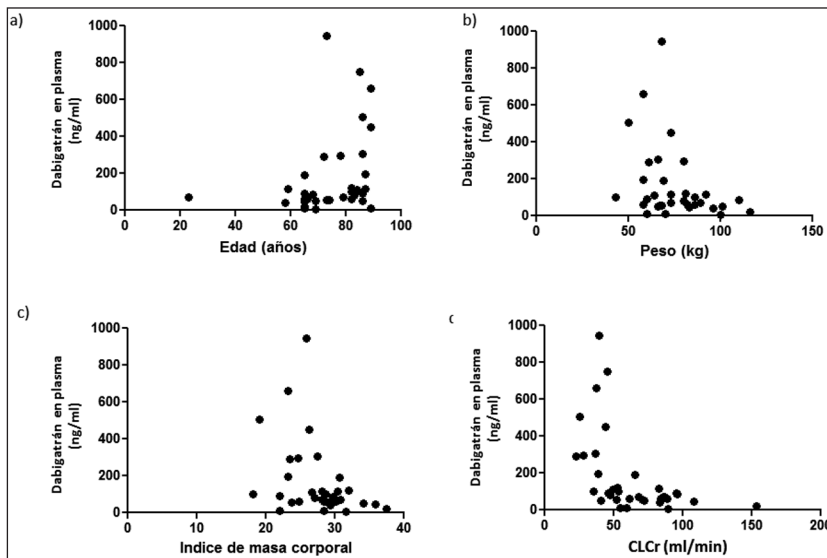


Fig. 3.- Correlaciones observadas entre las concentraciones plasmáticas de dabigatrán y la edad (a), el peso corporal (b), el índice de masa corporal (c) y el CLCr. Se expresa en todos los casos los coeficientes de correlación de Spearman (no paramétrico).

aquellos con CLCr en el tercil medio (49.2-72.2 ml/min) y en el tercil superior (82.8-153.2 ml/min) (Fig. 4).

Discusión

La concentración media medida a las 12 horas después de una dosis de 150 mg fue de 83 ng/ml (25-75 per-

centilo 61-143) en coincidencia con lo reportado para esta droga⁵.

El método *gold standard* para la determinación plasmática de dabigatrán es la cromatografía líquida de alta presión, seguida de detección por espectrometría de masa (LC-MS/MS), que no está disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos de rutina. El tiempo de trombina diluido utilizado en este estudio demostró arrojar resultados

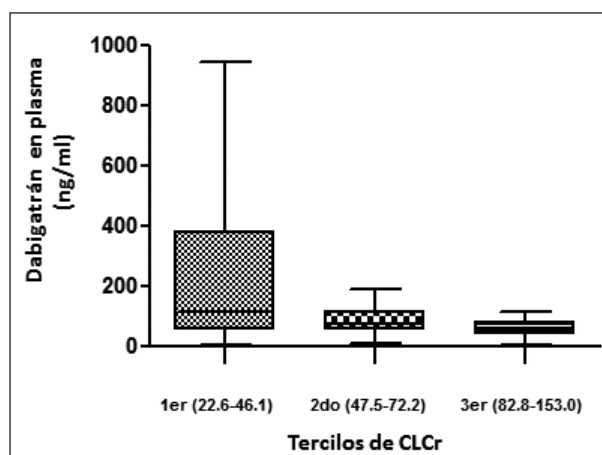


Fig. 4.— Distribución de las concentraciones plasmáticas de dabigatrán medidas en función del tercil de *clearance* de creatinina (CLCr) en gráfico de cajas que marcan los percentilos 25 y 75, la mediana y el rango de los valores obtenidos en cada tercil.

comparables en concentraciones > 50 ng/ml, y algo menos precisos a concentraciones < 50 ng/ml^{9, 10}.

Este trabajo nos permitió verificar el buen comportamiento analítico del ensayo *HemosIL DTI*, en cuanto a precisión (repetibilidad, reproducibilidad interensayo), exactitud (BIAS) y linealidad, asumiendo un error total permitido de 15% que es el adjudicado al tiempo de trombina. Existen pocos informes en la literatura sobre la utilización de este ensayo para determinar dabigatrán. Los datos de la concentración de dabigatrán en muestras procesadas en ambos coagulómetros fueron comparables (datos no mostrados).

En segundo lugar hemos evaluado el efecto de los niveles de dabigatrán plasmático en los resultados de las pruebas básicas de coagulación TP, APTT y TT. Hallamos correlaciones moderadas entre el TP o el APTT y la cc plasmática de la droga, siendo más afectado el APTT que el TP. Estos hallazgos coinciden con numerosas publicaciones^{6, 11-13}. Hemos verificado que el tiempo de trombina habitualmente utilizado en la práctica clínica es demasiado sensible y por lo tanto la utilidad de la prueba se limita a la exclusión de presencia de droga cuando arroja un resultado normal¹²⁻¹⁴.

Un hallazgo importante que confirma lo observado en la literatura, es que un APTT normal no descarta presencia de droga en concentraciones consideradas no seguras (> 30 ng/ml) para realizar, por ejemplo, una cirugía¹⁰. Adicionalmente, confirmamos con nuestro sistema reactivo-instrumento utilizado para APTT, que un valor > 2 veces el límite superior normal (> 78 seg) en el valle, se asoció frecuentemente (6/10 muestras) a cc > 200 ng/ml, concentración reconocida como asociada a mayor riesgo hemorrágico^{12, 15}. Los APTT prolongados en el valle dan

una idea cualitativa de concentración supra terapéutica de dabigatrán, pero pierden precisión en la estimación cuantitativa debido al aplanamiento de la curva APTT vs. nivel plasmático de dabigatrán a valores superiores a 250-300 ng/ml¹⁰⁻¹³.

En nuestro grupo de pacientes hemos hallado correlación negativa entre la cc de dabigatrán en el valle y el nivel de *clearance* de creatinina, demostrando que los pacientes con CLCr en el tercil inferior presentaban, como era esperable, las cc de droga más elevadas, en coincidencia con datos ya publicados^{15, 16}. De la misma manera existió una correlación negativa con el índice de masa corporal y positiva con la edad, factores que están asociados a un mayor riesgo de acumulación de droga, constituyendo la insuficiencia renal y el bajo peso extremo características que generan la necesidad de su monitoreo^{6, 12, 15}.

Una de las limitaciones del presente estudio es que 6 de los 40 pacientes incluidos en él fueron seleccionados por sospecha de acumulación de droga por presentar APTT muy prolongados obtenidos en muestras tomadas en el valle. Esto podría sesgar los resultados; no obstante, 14 pacientes presentaban CLCr < 50 ml/min, en 8/14 la cc de dabigatrán medida fue superior a 200 ng/ml en el valle. En esta pequeña población estudiada no se halló asociación entre la acumulación de droga y la dosis recibida, ya que 5 de los 8 pacientes que presentaban > 200 ng/ml en el valle recibían 110 mg/12 horas y solo tres 150 mg/12 horas.

En conclusión, el ensayo *HemosIL DTI* utilizado para determinar la concentración plasmática de dabigatrán presentó muy buena precisión y exactitud. Permitió estimar la cc de dabigatrán tanto en pacientes con función renal normal, como en aquellos con función renal deteriorada. Consideramos que la prueba es apta para la cuantificación de dabigatrán en plasma, tanto a niveles altos para descartar acumulación de droga ante el deterioro de la función renal como en niveles bajos pre cirugía o en situaciones de emergencia. Este estudio confirma la importancia del seguimiento regular del paciente anticoagulado con dabigatrán que incluya la evaluación de la función renal, así como de la medición de los niveles de droga en el valle en aquellos que desarrollan insuficiencia renal durante el tratamiento.

Agradecimientos: Agradecemos a la Sra. María Angélica D'Adamo su asistencia técnica, y a la empresa WM Argentina su donación del reactivo *HemosIL DTI* para la validación de la técnica realizada en el presente trabajo.

Conflicto de intereses: La Dra. Marta Martinuzzo ha participado como líder de opinión en el *Strategy Advisory Committee* de *Instrumentation Laboratory* realizado en Barcelona, abril 2016, recibiendo viáticos para su concurrencia.

La Dra. Cristina Duboscq es asesora científica de la empresa WM Argentina para sus productos de *Instrumentation Laboratory*.

El Dr. José Ceresetto declara haber recibido honorarios en algunas tareas docentes, de consultoría y conferencias realizadas para el laboratorio Boehringer Ingelheim.

Las Dras. Estela S. Viñuales y Diana Penchasky declaran haber recibido colaboración para concurrencia al *European and Mediterranean League against Thromboembolic Diseases* en el año 2016 por parte del laboratorio Boehringer Ingelheim.

Bibliografía

1. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al, RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361: 1139-51. Erratum in: *N Engl J Med* 2010; 363: 1877.
2. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014; 383 (9921): 955-62.
3. Schulman S, Kakkar AK, Goldhaber SZ, et al; RE-COVER II Trial Investigators. Treatment of acute venous thromboembolism with dabigatran or warfarin and pooled analysis. *Circulation* 2014; 129: 764-72.
4. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, et al; RE-MEDY Trial Investigators; RE-SONATE Trial Investigators. Extended use of dabigatran, warfarin, or placebo in venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2013; 368: 709-18.
5. Summary of product characteristics. Dabigatran. En: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24839>, 2012.
6. Lippi G, Favalaro EJ. Recent guidelines and recommendations for laboratory assessment of the direct oral anticoagulants (DOACs): is there consensus? *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: 185-97.
7. Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagul Fibrinol* 2012; 23: 138-43.
8. CLSI EP15-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999. En: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/EP5A2_sample.pdf; consultado el 20/3/2016.
9. Douxfils J, Dogné JM, Mullier F, et al. Comparison of calibrated dilute thrombin time and aPTT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with dabigatran etexilate. *Thromb Haemost* 2013; 110: 543-9.
10. Antovic JP, Skeppholm M, Eintrei J, et al. Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 1875-81.
11. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, et al. Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1116-27.
12. Lindahl TL, Baghaei F, Blixter IF, et al. Expert Group on Coagulation of the External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost* 2011; 105: 371-8.
13. Hapgood G, Butler J, Malan E, Chunilal S, Tran H. The effect of dabigatran on the activated partial thromboplastin time and thrombin time as determined by the hemoclot thrombin inhibitor assay in patient plasma samples. *Thromb Haemost* 2013; 110: 308-15.
14. Baglin T, Keeling D, Kitchen S. British Committee for Standards in Haematology. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2012; 159: 427-9.
15. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, et al, on behalf of the RE-LY Investigators. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients. The RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 321-8.
16. Hori M, Fukaya T, Kleine E, et al, the RE-LY Investigators. Efficacy and safety of dabigatran etexilate vs. warfarin in Asian RE-LY patients according to baseline renal function or CHADS2 score. *Circ J* 2015; 79: 2138-47.

Aclaración

Las características del sello que ilustra la tapa la del número 6 de 2016 de *Medicina (B Aires)*, Camillo Golgi (1843-19269, son las que siguen:

Sello postal de Italia (1994). Serie Europa y los descubrimientos. Retrato de Camillo Golgi, en ángulo inferior derecho, neuronas teñidas con la "reazione nera". Catálogo *Ivert et Tellier* N° 2058. Valor facial 750 liras. Sello y fotografía: Dr. Claudio Zuckerberg. Digitalización B.B.