



ORIGINALES

Monitorización terapéutica de la digoxinemia en pacientes con insuficiencia cardíaca: comparación entre dos métodos analíticos

Isabel Cristina Medeiros Barros¹, Elis Marra da Madeira Freitas¹, Salvador Rassi², Wilsone José Carneiro¹, Caroline Rego Rodrigues¹, Tereza Cristina de Deus Honório¹, Leonardo de Souza Teixeira³, Vania Rodríguez¹ y Luiz Carlos da Cunha¹

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas. NEPET. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

²Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás. ³Instituto de Ciências Farmacêuticas. ICF.

Resumen

Objetivo: Comparar las dos técnicas analíticas más utilizadas en la determinación de la digoxinemia y verificar cuál de ellas atiende mejor las necesidades de la rutina de seguimiento clínico de los pacientes con insuficiencia cardíaca.

Métodos: En este trabajo fue investigado el perfil clínico y de laboratorio de 15 pacientes con insuficiencia cardíaca los cuales fueron atendidos en el Ambulatorio para pacientes con Insuficiencia Cardíaca del Hospital das Clínicas de la Universidad Federal de Goiás, Brasil. Las muestras de sangre de los pacientes fueron recogidas y analizadas por Inmunoensayo y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS).

Resultados: Los resultados del test "t" de Student ($p = 0,05$) mostraron que hubo diferencia significativa entre los dos métodos analíticos. Las concentraciones determinadas por inmunoensayo fueron mayores que las concentraciones determinadas por LC-MS/MS, ya que ese método analiza la digoxina y también sus metabolitos y sustancias endógenas, mientras que el LC-MS/MS analiza solamente la molécula de digoxina. Por otro lado, ninguno de los pacientes, presentó datos clínicos relevantes sugestivos de intoxicación digital, a pesar de que varios fármacos con potencial de interacción estuvieron asociados al tratamiento.

Conclusiones: A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que el método por LC-MS/MS se mostró más selectivo y específico, siendo una opción para la monitorización terapéutica de la digoxina, desde que se obtengan valores de referencia para la digoxinemia por LC-MS/MS.

PALABRAS CLAVE

Digoxina; Insuficiencia cardíaca; Monitoreo plasmático; LC-MS/MS; Inmunoensayo.

Therapeutic drug monitoring of digoxin in cardiac heart failure outpatients: comparisons of two analytical methods

Abstract

Objective: To compare two analytical techniques used in the determination of plasma digoxin (LC-MS/MS and immunoassay) and to verify which one better answer the need of the clinical monitoring routine of patients with cardiac heart failure.

Method: The clinical findings in 15 cardiac heart failure (CHF) outpatients of the Cardiac Heart Service of the Goiás Federal University Clinical Hospital were investigated. Blood samples of the patients were collected and analysed by Immunoassay and by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Results: The results of the statistic test (Student $p = 0,05$) showed a significant difference between the analytical methods: immunoassay concentrations were higher than the concentrations determined by LC-MS/MS. The explanation may be because immunoassay method measures digoxin plus other metabolites and endogenous substances, while the LC-MS/MS method measures only the digoxin molecule. None of the patients, showed relevant clinical data suggestive of digitalis intoxication, even several drugs with potential interaction were associated with treatment.

Conclusion: It was concluded, therefore, that LC-MS/MS method is safer, more selective and specific than immunoassay, being an option for therapeutic drug monitoring of digoxin, since the reference values would be obtain for digoxinemia by LC-MS/MS.

KEYWORDS

Digoxin; Cardiac heart failure; Plasma concentrations; LC-MS/MS; Immunoassay.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vaniario2009@gmail.com (Vania Cristina Rodríguez Salazar)

Introducción

La insuficiencia cardíaca (IC) es un problema de salud pública de incidencia y prevalencia cada vez más creciente^{1,2}. En el Brasil se estima una prevalencia de esa enfermedad en 3,8% de la población y según datos del Instituto Brasileiro de Geografía y Estadística (IBGE) esta enfermedad es la causa más frecuente de internación hospitalar de pacientes con más de 60 años^{3,4}. El estudio EPICA, realizado en Portugal, mostró una prevalencia de IC de 4,36% en adultos mayores de 25 años de edad⁵. Por otro lado, en España el estudio PRICE evaluó la prevalencia de IC en los pacientes mayores de 45 años diagnosticados utilizando los criterios de Framingham, y observaron una prevalencia de 6,8%⁶.

La terapéutica de la insuficiencia cardíaca es realizada por tres tipos de tratamiento: el tratamiento no farmacológico, el farmacológico y el quirúrgico, de acuerdo con el grado de gravedad del síndrome. El primero se refiere a la identificación de la etiología y la eliminación de las causas no subyacentes, la eliminación o corrección de los factores agravantes, consejos, restricción de ejercicios físicos, oxigenoterapia, restricción hídrica, salina y nutricional y vacuna contra el virus de la gripe. El segundo tipo de tratamiento se fundamenta en la utilización de varias clases farmacológicas tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), los digitálicos, los diuréticos, los antagonistas de la aldosterona, los bloqueadores beta-adrenérgicos, los vasodilatadores directos, los antagonistas de los receptores de angiotensina II, los antagonistas de los canales de calcio, los antiarrítmicos y los anticoagulantes^{2,3,7}.

La digoxina posee estrecho margen terapéutico (la concentración terapéutica varía de 0,5 a 2,0 ng/mL) y es eliminada por la orina, la bilis y por biotransformación, con una semivida de eliminación de aproximadamente 36 h en pacientes con función renal normal^{8,9}. La digoxina atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria y, en caso de insuficiencia renal, su semivida de eliminación terminal es mayor y motiva la necesidad de un ajuste posológico¹⁰⁻¹².

Junto con reacciones adversas de la digoxina, se han descrito importantes interacciones medicamentosas, principalmente aquellas que modifican los parámetros farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y excreción renal). Entre los fármacos que alteran la farmacocinética de la digoxina están: verapamil, diltiazem, espironolactona, amiodarona y diuréticos que causan la depleción de potasio como la tiazida, la furosemida y el ácido etacrínico^{8,13,14}.

La monitorización terapéutica de fármacos (MTF, *therapeutic drug monitoring* = TDM) consiste en la determinación de las concentraciones plasmáticas de fármacos y de su perfil cinético. Varios métodos analíticos han sido utilizados para la realización de los estudios de MTF con la digoxina, abordando el establecimiento de niveles

terapéuticos, el diagnóstico de intoxicación digitalica, y la evaluación de la interacción con medicamentos y con alimentos. La mayoría de estos métodos utilizan equipos automatizados para inmunoensayo y algunas técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia, utilizando diferentes tipos de muestras biológicas, con la intención de correlacionar la concentración con los efectos clínicos de la digoxina en el organismo¹⁵⁻¹⁷.

La determinación de la concentración plasmática de la digoxina no es un procedimiento de rutina en el Ambulatorio de Insuficiencia Cardíaca del Hospital das Clínicas de la Universidad Federal de Goiás (HC-UFG), donde aproximadamente 25% de los pacientes utilizan digoxina y presentan marcadores que predicen mal diagnóstico. El perfil de las concentraciones plasmáticas de este fármaco es desconocido y los ajustes de la dosis son realizados empíricamente con base en los exámenes clínicos. Por ese motivo, la cuantificación de la digoxina plasmática en estos pacientes se mostró extremadamente necesaria, visto que es un parámetro esencial para determinar si la dosis está por debajo de la recomendada o si es tóxica.

El objetivo de este trabajo fue comparar las dos técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de digoxina plasmática (LC-MS/MS e inmunoensayo) e indicar cuál de ellas presenta más ventajas para la rutina de la monitorización terapéutica de la digoxina en pacientes con insuficiencia cardíaca.

Material y métodos

Consideraciones bioéticas

Este trabajo fue evaluado por el Comité Ético de Investigación en Humanos y Animales del HC-UFG con el número de protocolo 020/2007, siendo aprobado el 29/03/2007.

Pacientes

Fueron seleccionados 15 pacientes del Servicio de Cardiología del Hospital das Clínicas de la UFG, obedeciendo los siguientes criterios: edad superior a 18 años, al menos 1 mes de tratamiento con digoxina y adecuada escolarización (pacientes alfabetizados o que tenían una persona responsable alfabetizada). Los pacientes seleccionados no estaban participando de otro estudio de investigación y firmaron el Término de Consentimiento Libre e Informado.

Recogida de muestras de sangre y formulario de datos del paciente

La concentración plasmática mínima (C_{min}) fue determinada a partir de muestras de sangre obtenidas inmediatamente antes de la administración de la próxima dosis del medicamento, después de que la concentración

del fármaco hubiera alcanzado el estado estacionario (de 8 a 10 días después del inicio del tratamiento)^{18,19}. Una segunda muestra fue obtenida 30 días después. Tras su obtención, la muestra de sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 min, y el suero almacenado a -20 °C hasta su análisis.

Antes de obtener la muestra de sangre, cada paciente fue consultado sobre la administración del medicamento, edad, peso, altura, utilización de otros medicamentos, hábitos (tabaquismo, alcoholismo) y los resultados de los exámenes de laboratorio complementarios fueron anexados en formularios apropiados. También fue realizada la estimación del índice de masa corporal (IMC). Se obtuvo la segunda muestra de sangre en 8 de los 15 pacientes en quienes fue recogida la primera muestra de sangre.

Métodos para la determinación de la concentración sérica de la digoxina

Dos métodos fueron utilizados para determinar la concentración sérica de la digoxina, uno de ellos fue por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS) (realizado en el Instituto de Ciencias Farmaceuticas-ICF, Goiânia-GO) y el otro por Inmunoensayo por fluorescencia polarizada (realizado en el Laboratorio Atalaia, Goiânia-GO).

El método por LC-MS/MS utilizó una columna cromatográfica RP18 y el espectrómetro de masas (API 5000™) con fuente de ionización por *electrospray*. La digoxina fue analizada por ionización negativa y el equipo fue operado en el modo MRM (*multiple reaction monitoring*). La curva de calibración fue lineal entre 50,0-6000,0 pg/ml, el límite de cuantificación fue de 50 pg/mL y el tiempo de retención del pico de digoxina fue de 2,09 min. El patrón interno utilizado fue la dexametasona y el método de extracción utilizado fue extracción líquido-líquido, obteniéndose una recuperación mediana de 73,8%. Entre los parámetros de validación evaluados, se obtuvo que la exactitud del método estuvo entre 86-112,4%, la precisión de 4,1-11,3% y la estabilidad estuvo de acuerdo con la recomendada por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA) en la resolución RE 899/2003²⁰. Esta técnica fue validada para la realización de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia de comprimidos de digoxina, demostrando ser específico, sensible y rápido para la cuantificación sérica de la digoxina²¹.

Los análisis de digoxina por el método de inmunoensayo por fluorescencia polarizada (FPIA) fueron realizados en el equipo *Immolute 2000 Digoxin* (Siemens™), un tipo de inmunoensayo enzimático de fase sólida competitivo por quimioluminiscencia²².

Análisis estadístico

Fueron aplicadas pruebas estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, mediana, máximo, mínimo, por-

centajes) para los datos obtenidos de los pacientes. Para comparación de los resultados analíticos de la digoxina en suero se utilizó el test "t" de *Student*. Fueron considerados significativos aquellos valores con $p < 0,05$ para comparación de las medias. Los resultados analíticos fueron tabulados como Media $\pm$ DE (N = 46) (software OriginPro™ 7.5).

RESULTADOS

En la tabla 1 están descritas las características de los pacientes y también los datos clínicos de la consulta más próxima de cada recogida de muestras de sangre. Ninguno de los pacientes presentó datos clínicos relevantes que sugirieran sospecha de intoxicación digitálica. La concentración de potasio en suero apareció aumentada en el 26,67% de los pacientes, siendo esta la única alteración observada en los exámenes de laboratorio. Con relación a la medición de la presión arterial, todos los pacientes presentaron presión sistólica controlada. La media de la fracción de eyección (FE) fue de $41,7 \pm 9\%$; por lo tanto, ningún paciente presentó FE como marcador de mal pronóstico.

La mayoría de los medicamentos prescritos a los pacientes cardíacos presenta interacción con la digoxina. Sin embargo, en este estudio no fueron detectados datos clínicos o de laboratorio que sugirieran algún daño de los pacientes como consecuencia de la interacción medicamentosa. Con relación a la prescripción que los pacientes entrevistados estaban recibiendo, las clases farmacológicas descritas en la tabla 1 están de acuerdo con las citadas en la literatura para el tratamiento de la IC.

Considerando el intervalo terapéutico establecido de 0,5 a 2,0 ng/mL, como puede observarse en la figura 1, apenas una de las 46 determinaciones realizadas por los dos métodos, presentó concentración ligeramente superior a la del límite máximo del intervalo terapéutico (primera colecta del paciente 10 analizada por inmunoensayo). Sin embargo, una nítida diferencia de valores entre los métodos también pudo ser observada. Las primeras colectas de los pacientes P2, P4, P5, P7, P8 y las segundas colectas de los pacientes P9, P10 y P11, analizadas por LC/MS/MS presentaron concentraciones por debajo de 0,5 ng/mL. Los resultados del análisis por LC-MS/MS mostraron que 15 muestras séricas presentaban concentraciones de digoxina dentro del intervalo terapéutico, mientras que por el método de inmunoensayo fueron 22 las muestras en este intervalo. Las medias, fueron comparadas utilizando el test "t" de *Student* ($p = 0,05$), que resultó en una diferencia significativa entre el Grupo A (concentraciones plasmáticas de digoxina analizadas por LC-MS/MS) y el Grupo B (concentraciones plasmáticas de digoxina analizadas por Inmunoensayo por Quimioluminiscencia).

La variación de la concentración plasmática entre la primera y la segunda colecta fue de 29% y 53% para el

Tabla 1. Características antropométricas, clínicas y de uso de medicamentos de los pacientes con insuficiencia cardíaca del Ambulatorio de Insuficiencia Cardíaca del Hospital das Clínicas de la Universidad Federal de Goiás

Parámetro	n (%)
Edad (años)	
30-45	2 (13,3)
46-60	8 (53,3)
61-75	5 (33,3)
Género	
Femenino	4 (26,7)
Masculino	11 (73,3)
Etiología de la Insuficiencia cardíaca	
Enfermedad de Chagas	4 (26,7)
Hipertensión	3 (20,0)
Cardiomiopatía isquémica	2 (13,3)
Cardiomiopatía idiopática	3 (20,0)
Clase funcional según la NYHA	
I	5 (33,3)
II	8 (53,3)
III	2 (13,3)
Medicamentos Asociados (ATC)	
Inhibidores de la ECA (C09B)	8 (53,3)
Bloqueador adrenérgico (C07A, C07C)	7 (46,7)
Diurético (C03B, C03C, C03E)	13 (86,7)
Antagonista de la aldosterona (C03D)	7 (46,7)
Antagonista del receptor de angiotensina (C09C, C09D)	4 (26,7)
Antiarrítmicos clase I e III (C01B)	3 (20,0)
Anticoagulante oral (C05BA)	4 (26,7)
Antagregantes plaquetarios (B01AC)	3 (20,0)
Antagonistas H ₂ (A02BA)	2 (13,3)
Co-morbidades y agravantes	
Diabetes	3 (20,0)
Tabaquismo	2 (13,3)
Ex-tabaquismo	8 (53,3)
Ex-etilista	3 (20,0)
Hipertensión arterial	4 (26,7)
DPOC	1 (6,7)
Hipertiroidismo	1 (6,7)
Sobrepeso	1 (6,7)
Obesidad grado I	1 (6,7)
Manifestación de señales de la Insuficiencia Cardíaca	
Fibrilación atrial	1 (6,7)
Edema de miembros inferiores	1 (6,7)
Presión arterial sistólica media, mmHg (DE)	11,2 (1,6)
Frecuencia cardíaca media, bpm (DE)	76 (13,4)
Fracción de eyección media (DE)	41,7 (9,2)
Creatinina sérica media, mg/dL (DE)	1,1 (0,2)
Sodio sérico medio, mEq/L (DE)	135,9 (2,9)
Potasio sérico medio, mEq/L (DE)	4,6 (0,8)
Potasio sérico 4,8-6,6 mEq/L	4 (26,7%)

NYHA: New York Heart Association; ECA: enzima convertidora de angiotensina; DPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; mmHg: milímetro de mercurio; DE: desvío estándar; mEq/L: miliequivalente por litro; n (%): valor absoluto (valor relativo). VR: valor de referencia. Presión arterial sistólica (VR: 12x8 mmHg); Fracción de eyección (VR: $\geq 50\%$); Creatinina sérica (VR: 0,7-1,3 mg/dL hombre y 0,6-1,2 mg/dL mujer); Sodio sérico (VR: 135-144 mEq/L); Potasio sérico (VR: 3,6-4,8 mEq/L)

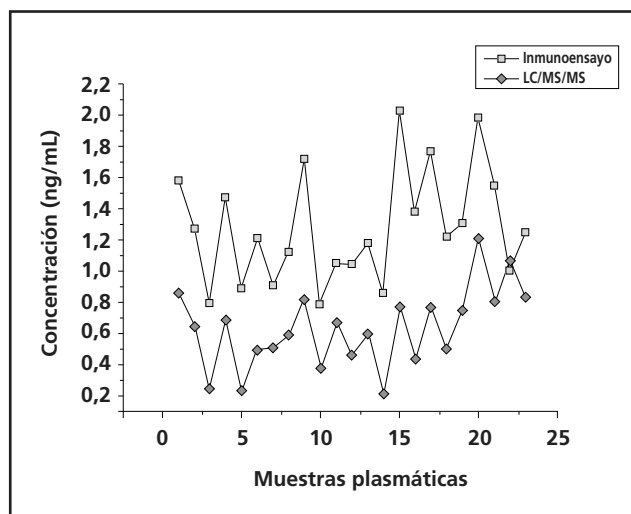


Figura 1. Concentración plasmática de la digoxina (ng/mL) analizada por inmunoensayo y por LC-MS/MS de 15 pacientes del Ambulatorio de Insuficiencia Cardíaca del HC-UFG (n = 23).

inmunoensayo y el LC-MS/MS, respectivamente. Ciertamente, las características individuales de cada paciente, así como la conocida variabilidad de la digoxinemia en pacientes que usan digitálicos deben haber contribuido en esta variación. Siendo así, de modo general las diferencias observadas al comparar la digoxinemia de los pacientes que retornaron al ambulatorio con un intervalo de 30 días (n = 8), ya eran esperadas y no comprometieron el tratamiento de los pacientes ni alteraron la clínica de los mismos.

Discusión

El inmunoensayo es un método ampliamente utilizado en estudios tanto farmacocinéticos como de control terapéutico^{15,16,18,23}. Esta metodología es utilizada en la determinación de las sobredosis en pacientes tratados con glicosídeos cardíacos y en la confirmación de situaciones clínicas en las que los síntomas de un paciente puedan ser debidos tanto a la propia enfermedad cardíaca como a la intoxicación digitálica. El inmunoensayo también se utiliza en la documentación de la adherencia al tratamiento, la infra o sobredosificación y el seguimiento clínico en circunstancias clínicas especiales como hipocalcemia, hipomagnesemia, hipercalcemia, hipoxia, alcalosis o función renal deteriorada^{22,24}. No obstante su amplia utilización, el inmunoensayo de digoxina presenta interferencias analíticas con fármacos semejantes y con metabolitos presentes en la matriz biológica²³.

Muchos factores fisiológicos, farmacológicos, patológicos y genéticos pueden afectar la interpretación de los resultados por inmunoensayo. La presencia de un factor inmunoreactivo endógeno, similar a la digoxina, fue reportada en suero de pacientes con daño renal y hepático; la presencia de estos factores puede llevar a resultados

falsamente elevados²⁴. Además, anticuerpos heterofílicos de suero humano pueden reaccionar con inmunoglobulinas incluidas en los componentes del ensayo causando interferencia en los inmunoensayos *in vitro*. Por lo tanto el método descrito es, muy sensible, sin embargo, poco selectivo²².

El método analítico en cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) es específico, sensible y rápido para la cuantificación sérica de la digoxina. En este método, solo se cuantifica la digoxina, sin interferentes tales como fármacos, metabolitos o sustancias endógenas. Es por ello que esta técnica mostró una tendencia a presentar valores de concentración sérica más bajos que la técnica de inmunoensayo²¹.

En ese sentido, ya existen algunos trabajos que intentan correlacionar la afinidad y la actividad intrínseca de la digoxina con la ATPasa dependiente de sodio y potasio (NaK-ATPasa), solamente con los niveles de digoxina, obtenidos por LC/MS/MS, sin la interferencia de metabolitos activos o de factores inmunorreactivos similares a la digoxina¹⁵⁻¹⁷.

De esa manera, a pesar de la necesidad de establecer mejor los valores de referencia y del costo todavía ser elevado para algunos laboratorios, la técnica por LC-MS/MS es bastante atrayente, ya que necesita de menores volúmenes de muestra, no depende de extensa limpieza de la muestra, es segura, más sensible y específica²³. Por otro lado además de ser un procedimiento más rápido que el inmunocromatográfico, se vuelve más adecuado para una rutina de grandes volúmenes de análisis^{25,26}. Al realizar comparaciones entre métodos diferentes, un aspecto muy importante es que no debe ajustarse la dosis basándose solamente en los resultados analíticos, ya que además de las diferencias de valores entre los métodos, los niveles terapéuticos de la digoxina presentan alto grado de variabilidad y muchas veces se superponen a los de la toxicidad. Por lo tanto no sirven como único parámetro para confirmar o descartar el diagnóstico de intoxicación digitálica³. Se han descrito respuestas tóxicas asociadas a concentraciones séricas de digoxina a partir de 1,7 ng/mL y, en ocasiones, se evidencian contradicciones entre niveles séricos y resultados clínicos. Asimismo, una digoxinemia inferior a 0,5 ng/mL puede presentarse con una respuesta terapéutica adecuada y una digoxinemia superior a 2,0 ng/mL no condiciona necesariamente la presencia de signos o síntomas de intoxicación digitálica.

Los estudios a ser realizados en este sentido deben considerar que el nivel sérico es solamente una fracción del total del fármaco en el organismo. La semivida de la digoxina puede prolongarse mucho (en el orden de 100 horas) en pacientes anúricos debido al elevado volumen de distribución de la digoxina y su capacidad de unirse ampliamente a los tejidos corporales²⁷. La variabilidad de las concentraciones plasmáticas de la digoxina ya son bien

conocidas, tanto que el Digitalis Investigation Group, un respetado grupo de especialistas patrocinados por Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica propuso alterar los valores de referencia para un intervalo terapéutico más bajo de 0,5 a 0,8 ng/mL de digoxina²⁸.

Algunos fármacos usados por los pacientes estudiados en este trabajo que podrían alterar la detección de la digoxina elevando los valores encontrados por medio de interacción medicamentosa son: la espironolactona (antagonista de la aldosterona), la amiodarona (antiarrítmico), furosemida y la hidroclorotiazida (diuréticos), lo cual ya fue comprobado en 46,67%, 20,0% e 86,67% de los casos, respectivamente (Tabla 1).

La hipocalcemia inducida por la furosemida y por la hidroclorotiazida puede aumentar la sensibilidad a los digitálicos^{15,17,29,30}, hecho que también fue observado en 26,7% de los pacientes estudiados en esta investigación.

A pesar de que las concentraciones séricas de digoxina medidas por LC-MS/MS se mostraron más bajas, ninguno de los pacientes presentó datos clínicos o en los electrocardiogramas compatibles con la infradosificación, lo que indica que las dosis administradas fueron satisfactorias^{18,19}.

A partir de lo expuesto puede concluirse que sustancias endógenas y exógenas pueden ser un problema común para los métodos de inmunoensayo de digoxina, provocando resultados falsamente elevados, mientras que el LC-MS/MS es un método más selectivo y sensible. Por esos motivos este método sería el más indicado para el monitoreo plasmático de la digoxina, utilizando valores de referencia adecuados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Federal de Goiás (UFG), al Laboratório Atalaia y al Instituto de Ciencias Farmacéuticas (ICF) por el apoyo en la realización de este trabajo.

Financiación del estudio

Este estudio contó con la financiación de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) FAPEG Edital 01/2007-Rede goiana de pesquisa monitorização terapêutica, toxicológica e controle de qualidade de medicamentos (No processo 20070020940161).

Bibliografía

1. Timerman A, César LAM, editores. Manual de Cardiologia: Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Ediciones. Atheneu, São Paulo; 2000.
2. Loures VA, Noronha MF, Bastos RG, Girardi JM. Aspectos clínicos e epidemiológicos da insuficiência cardíaca. HU Revista, Juiz de Fora. 2009;35(2):89-96.
3. Guimarães JI, Mesquita ET, Bocchi EA, Vilas-Boas F, Montera MW, Moreira, MCV et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. Arq Br de Cardiol. 2002;79(Suppl 4):1-30.

4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil 2009 (acceso en junio de 2013). Disponible en: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/.
5. Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, Costa C, et al; EPICA Investigators. [Epidemiology of heart failure in mainland Portugal: new data from the EPICA study]. *Rev Port Cardiol*. 2004;23(Suppl 3):III15-22.
6. Anguita Sánchez M, Crespo Leiro MG, de Teresa Galván E, Jiménez Navarro M, Alonso-Pulpón L, Muñoz García J. PRICE Study Investigators. Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(10):1041-9.
7. Bocchi EA, Vilas-boas F, Perrone S, Caamaño AG, Clausell N, Moreira MC, et al. Diretriz Latino-americana para Avaliação e Conduta na Insuficiência Cardíaca Descompensada. *Arq Br de Cardiol*. 2005;85(Supl III):1-48.
8. Hallworth M, Capps N, editores. *Therapeutic Drug Monitoring, Clinical Biochemistry in Medicine*. Ediciones ACB Venture Publications. London: 1993.
9. Hardman JG, Limbird LE. Editores. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed, New York: McGraw Hill, 2003; p. 679-730.
10. Neto JMR. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Revista da SOCESP*. 2004;14(1).
11. Polanczyk CA. Fatores de Risco Cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos. *Arq Br de Card*. 2006;84(3).
12. Goldberger Z, Goldberger A. Therapeutic Ranges of Serum Digoxin Concentrations in Patients With Heart Failure. *AM J Cardiol*. 2012;109:1818-1821.
13. Mooradian AD. Digitalis: An update of clinical pharmacokinetics, therapeutic monitoring techniques and treatment recommendations. *Clin Pharmacokinet*. 1988;15:165-79.
14. Tatro DS. *Drug Interaction Facts*. St. Louis: Facts and Comparisons; 1999.
15. Johne A, Brockmöller J, Bauer S, Maurer A, Langheinrich M, Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66(4):338-45.
16. Becquemont L, Verstuyft C, Kerb R, Brinkmann U, Lebot M, Jaillon P, Funck-Brentano C. Effect of grapefruit juice on digoxin pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70(Supl 4):311-6.
17. Dasgupta, PA, Wells A, Actor JK. Effect of Indian Ayurvedic medicine Ashwagandha on measurement of serum digoxin and 11 commonly monitored drugs using immunoassays: study of protein binding and interaction with Digibind. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(8):1298-303.
18. Konishi H, Shimizu S, Chiba M, Minouchi T, Koida M, Yamaji A. Predictive performance of serum digoxin concentration in patients with congestive heart failure by a hyperbolic model based on creatinine clearance. *J of Clin Pharmacol Ther*. 2002;27:257-65.
19. Deveaux M, Révuelta E, Mornay E, Hédouin V, Gosset D. Immunoassay of digoxin in hair. *Forensic Science International*. 1997;84:219-23.
20. ANVISA. Resolução n. 899, 29 de maio de 2003. (Acceso en octubre de 2003) Disponible em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899.htm>.
21. Teixeira LS, Mundim IM, Souza WC, Ramos DR, Bellorio KB, Marques FG, et al. Fast LC/MS electrospray ionization method for the quantification of digoxin in human plasma and its application to bioequivalence study. *Chromatographia*. 2009;69:S149-56.
22. Immulite 2000 Digoxin. *Diagnostics Products Corporation Instruction Manual*. Los Angeles, USA, 2005.
23. Adaway J, Keevil B. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatograph B*. 2012;883-884:33-49.
24. Valdes RJ. Endogenous digoxin-like immunoreactive factors: impact on digoxin measurements and potential physiological implications. *Clin Chem*. 1985;9:1525-32.
25. Li S, Yu C. Reply to "Does liquid chromatography-tandem mass spectrometry have a role in therapeutic drug monitoring of digoxin?" *Clin Biochem*. 2010;43(938).
26. Hirabayashi H, Sugimoto H, Matsumoto S, Amano N, Moriwaki T. Development of a quantification method for digoxin, a typical P-glycoprotein probe in clinical and non-clinical studies, using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: The usefulness of negative ionization mode to avoid competitive adduct-ion formation. *J Chromatogr B* 2011;879:3837-44.
27. Palacios Zabalza I, Corcostegui Santiago B, Peral Aguirre-gotia Farm Hosp. 2013;37(2):166-72.
28. Digitalis Investigation GROUP. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med*. 1997;336(8):535-3.
29. Murray MD, Young J, Hoke S, Tu W, Weiner M, Morrow D et al. Pharmacist intervention to improve medication adherence in heart failure: a randomized trial. *Ann Internal Med*. 2007;146(10):714-25.
30. Dawson A, Buckley N. Digoxin. *Spec Subst*. 2012;40(3):122-3L.
31. Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras de Hipertens*. 2001;8(4):383-92.