

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**FARMACOGENÉTICA DA VARFARINA: PROPOSTA DE UM  
ALGORITMO PARA A PREDIÇÃO DE DOSE**

**MARIANA RODRIGUES BOTTON**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz**

**Colaboradora: Dra. Eliane Bandinelli**

Porto Alegre, abril de 2010.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

---

Este trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Genética Humana e de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Institutos do Milênio (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha mãe, por tudo o que abriu mão por mim, pelo apoio, carinho e amor incondicionais.

Ao meu pai, pelo carinho e por torcer por mim sempre.

À minha irmã, primos e dindos por estarem sempre torcendo mesmo sem entenderem direito o que é “essa tal de farmacogenética”.

Aos meus tios Iara, Yolanda e José, pelo carinho, preocupação e torcida constantes.

Ao Gustavo, por todo o apoio, pelas discussões científicas e não científicas, revisões de textos, pelo carinho, amor, confiança e por sempre torcer muito por mim.

Ao Chico, pelas brincadeiras e pelo carinho.

Aos meus sogros, Rosina e Emílio, pelo carinho e apoio.

À minha orientadora, Mara Helena Hutz, por ter acreditado e confiado em mim, por todo o apoio, carinho e por mostrar-se sempre disposta a me ajudar.

À Eliane Bandinelli, por ter abraçado este projeto comigo desde o começo, pelas idéias, discussões e pelo carinho.

Ao professor Israel Roisenberg, pelo carinho e idealização deste estudo.

Aos professores do Departamento de Genética, por todos os conhecimentos e experiências transmitidos.

Ao Dr. Luís Eduardo Rohde e Dr. Luís Carlos Amon, por terem permitido nosso acesso aos pacientes dos ambulatórios de anticoagulação, por todas as discussões e ajuda na parte clínica.

À Kátia Santos, pela amizade, confiança e por permitir que eu utilizasse seu laboratório para estocar as amostras de sangue dos pacientes durante todo o tempo de coleta.

À enfermeira Graziella Aliti, por ter permitido que eu acompanhasse as consultas dos pacientes no ambulatório, pela ajuda inicial nas coletas das amostras e por todo o apoio que foi indispensável à realização deste projeto.

À nutricionista Gabriela Souza, por todo o apoio, pela ajuda na etapa final das coletas de amostras e de dados dos pacientes.

À Taciane Borsatto, por todo o apoio e pela ajuda indispensável na etapa de coleta de dados clínicos dos pacientes.

Às colegas do Laboratório de Hemostasia, Ana Maria, Roberta, Fernanda, Daiane, Clévia, Carla, Celina e Luciana pelo apoio e amizade.

A todos os colegas do laboratório de Genética Humana, em especial à Luciana, Tatiana, Angélicas, Júlia, Vinícius, Verônica, Nina, Evelise, Caio e Gláucia pela convivência agradável e pela amizade.

À Júlia Genro e ao Vinicius Sortica pela disposição de me ensinarem a utilizar a metodologia de PCR em tempo real e pela amizade.

Aos colegas e amigos do PPG, Pollyanna, Eduardo, Vanessa, Gabriela, Nadine, Bruno, Dinler e Maurício por todas as conversas científicas e não científicas e por todo o apoio.

Aos amigos da vida Luciana, Karoline, Ana Paula, Andressa, Daiane, Ricardos e Marcondes pelos momentos de descontração.

Aos órgãos financiadores deste projeto, em especial ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Ao Elmo e à Ellen por toda a ajuda, dedicação e por estarem sempre dispostos a resolver problemas de última hora.

## SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES .....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	10
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. ANTICOAGULANTES ORAIS.....	13
1.2. FARMACOLOGIA DOS CUMARÍNICOS .....	14
1.2.1. Farmacocinética.....	14
1.2.2. Farmacodinâmica .....	16
1.3. VARIABILIDADE À SENSIBILIDADE AOS CUMARÍNICOS.....	19
1.3.1. Variabilidade Genética.....	21
1.3.1.1 Gene CYP2C9.....	23
1.3.1.2 Gene VKORC1 .....	28
1.3.1.3 Gene CYP4F2 .....	33
1.3.1.4 Gene do Fator II .....	34
1.4. APLICAÇÃO CLÍNICA.....	35
CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	39
CAPÍTULO 3. Influence of genetic and non-genetic factors on warfarin response: a new algorithm for dose prediction in Southern Brazilian population. ....	42
CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO .....	68
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS .....	87
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

---

ABCB1/MDR1: glicoproteína-P

APOE: apolipoproteína E

AVC: acidente vascular cerebral

BMI: “body mass index”

BSA: “body surface area”

CALU: calumenina

CYP2C9: citocromo P450 isoenzima 2C9

CYP3A4: citocromo P450 isoenzima 3A4

CYP4F2: citocromo P450 isoenzima 4F2

EPHX1: epóxido hidrolase microssomal

F2: fator II

F7: fator VII

FDA: “Food and Drug Administration”

GGCX: gama-glutamil carboxilase

GWAS: “genome wide association study”

IMC: índice de massa corporal

INR: razão normalizada internacional

kb: kilo bases

LD: “loop diuretic”

MAF: “minor allele frequency”

mg: miligrama

PCR: reação em cadeia da polimerase

PROC: proteína C

SNP: "single nucleotide polymorphism"

UTR: "untranslated region"

VKORC1: vitamina K epóxido redutase

## RESUMO

---

A varfarina é um medicamento da classe dos anticoagulantes orais cumarínicos muito utilizada na profilaxia de doenças tromboembólicas. Existe uma grande variação interindividual na resposta aos cumarínicos, uma vez que a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento variam de acordo com fatores ambientais e genéticos. As enzimas CYP2C9, responsável pela maior parte da metabolização do fármaco, e VKORC1, alvo dos cumarínicos, estão diretamente envolvidas na farmacocinética e farmacodinâmica da varfarina, respectivamente. A enzima CYP4F2, envolvida na metabolização de vitamina K, atua de forma indireta na farmacodinâmica do medicamento. O fator II é um fator de coagulação dependente de carboxilação, sendo sua funcionalidade dependente da atuação da varfarina. Polimorfismos nestes genes estão relacionados com variação na resposta ao medicamento.

Neste trabalho foi investigada a influência dos polimorfismos CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 no gene *CYP2C9*, -1639G>A, 1173C>T e 3730G>A no gene *VKORC1*, 1347C>T no gene *CYP4F2* e 494C>T no gene *F2* na dose/resposta de varfarina de forma independente, assim como foi elaborado um modelo incluindo fatores genéticos e não-genéticos capazes de predizer a dose de varfarina necessária a cada paciente.

Para a realização das análises foram estudados 279 pacientes usuários de varfarina provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com ascendência européia. Todos os SNPs dos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* e *F2* foram identificados pelo sistema TaqMan de discriminação alélica através de PCR em tempo real.



Os alelos *CYP2C9\*2* ( $P<0,001$ ) e *CYP2C9\*3* ( $P<0,001$ ) do gene *CYP2C9*, -1639A ( $P<0,001$ ) e 1173T ( $P<0,001$ ) do gene *VKORC1* e 494T do gene *F2* são responsáveis pela necessidade de uma dose menor do anticoagulante. Em contrapartida, os alelos 1347T do gene *CYP4F2* e 3730A ( $P<0,001$ ) do gene *VKORC1* são responsáveis pela necessidade de uma dose maior de varfarina. Os valores de P referentes aos polimorfismos nos genes *CYP4F2* e *F2* referem-se à análise multivariada, após controlar por confundidores, pois na análise univariada estes polimorfismos não apresentaram associação com a dose de varfarina.

A partir destes polimorfismos e de algumas variáveis clínicas foi elaborado um algoritmo que consegue explicar 63,3% da variação de dose de varfarina. Este algoritmo incluiu os seguintes fatores: peso, idade, uso de anlodipino, amiodarona, carbamazepina,  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos de alça e polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* e *F2*. A média da diferença absoluta entre a dose predita e a dose observada foi de 6,9 mg/semana e a correlação entre as doses predita e observada foi  $r_s=0,77$ .

O modelo sugerido é um dos que apresenta maior coeficiente de determinação entre os descritos na literatura, porém, para que seja possível um futuro uso clínico é necessário que seja validado em uma amostra independente. Mais estudos também são necessários para que se consiga determinar os outros fatores que expliquem os 40% da variação de dose não explicada até o momento.

## ABSTRACT

---

Warfarin is a drug from coumarin anticoagulant class widely used for thromboembolic disease prophylaxis. There is a wide interindividual variation in response to coumarins, since the pharmacokinetics and pharmacodynamics of this drug vary with environmental and genetic factors. The CYP2C9 enzyme, responsible for drug metabolism, and VKORC1, the coumarin target, are directly involved in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin, respectively. The CYP4F2 enzyme, involved in the metabolism of vitamin K, acts indirectly on the pharmacodynamics of the drug. Factor II is a coagulation factor dependent on carboxylation, and its function depends on warfarin action. Polymorphisms in these genes are related to drug variation response.

In this study we investigated the influence of the CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 polymorphisms in CYP2C9 gene, -1639G>A, 1173C>T and 3730G>A in the VKORC1 gene, 1347C>T in the CYP4F2 gene and 494C>T in the F2 gene with warfarin dose/response independently. In addition, a model including genetic and nongenetic factors able to predict warfarin dose needed for each patient was developed.

The analysis was performed with 279 patients of European ancestry from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre taking warfarin. All SNPs from CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and F2 genes were identified by TaqMan system of allelic discrimination by real-time PCR.

The CYP2C9\*2 (P <0.001) and CYP2C9\*3 (P <0.001) polymorphisms in the CYP2C9 gene, -1639G>A (P <0.001) and 1173C>T (P <0.001) in VKORC1

gene and 494C>T in F2 gene are responsible for lower doses of anticoagulant. In contrast, the SNPs 1347C>T in the CYP4F2 gene and 3730G>A ( $P < 0.001$ ) in VKORC1 gene are responsible for higher doses of warfarin. P values regarding CYP4F2 and F2 polymorphisms refer to multivariate analysis after controlling for confounders, since in the univariate analysis these polymorphisms were not associated with warfarin dose.

An algorithm considering these polymorphisms and some clinical variables was developed that explains 63.3% of the variation in warfarin dose. This algorithm included the following factors: body weight, age, use of anlodipine, amiodarone, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, loop diuretics and polymorphisms in CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and F2 genes. The average absolute difference between the predicted dose and observed dose was 6.9 mg/week and the correlation between the observed and predicted doses was  $r_s=0.77$ .

The model suggested is one with the higher coefficient of determination among those described in the literature, however, for a possible future clinical use it must be validated in an independent sample. More studies are warranted to find other factors that explain the 40% dose variation not explained so far.

**CAPÍTULO 1**

***INTRODUÇÃO***

---

## 1.1. ANTICOAGULANTES ORAIS

Anticoagulantes orais são muito utilizados na prática clínica para a prevenção e tratamento de pacientes com desordens tromboembólicas arteriais e venosas (Hirsh *et al.*, 2001). As indicações mais comuns de anticoagulantes são: fibrilação atrial, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, prótese de válvula, cardiomiopatia, infarto do miocárdio e isquemia (Gage *et al.* 2004). A classe de anticoagulantes orais mais utilizada é a das cumarinas, da qual fazem parte a varfarina, a femprocumona e o acenocumarol. Em um estudo realizado por Connolly *et al.* (2006), a terapia com anticoagulantes orais cumarínicos mostrou ser superior à associação de clopidogrel com aspirina na prevenção de eventos vasculares em pacientes com fibrilação atrial que apresentavam um alto risco de acidente vascular cerebral. Porém, os cumarínicos dobram a incidência de hemorragia (White *et al.*, 1999). A taxa de hemorragia é maior durante os primeiros meses de terapia (Fihn *et al.*, 1993; Landefeld *et al.*, 1993; Beyth *et al.*, 2000; Douketis *et al.*, 2000; Linkins *et al.*, 2003; Hylek *et al.*, 2007).

Com o propósito de um tratamento eficaz e seguro, as doses administradas a cada paciente devem ser ajustadas. Existe uma grande variação interindividual na resposta aos cumarínicos, uma vez que a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento variam de acordo com o peso, a alimentação, o sexo, o uso de outras medicações e fatores genéticos (Gage *et al.*, 2004).

Do ponto de vista químico, os anticoagulantes orais pertencem ao grupo 4-hidroxi-cumarínico e compartilham uma estrutura química similar. Cada

fármaco é composto por uma região central quiral que dá origem a 2 enantiômeros: R e S. Os dois enantiômeros diferem nas concentrações plasmáticas, na potência antitrombótica e na especificidade das isoenzimas responsáveis pelo seu metabolismo, sendo que o enantiômero S é de 2 à 5 vezes mais potente do que o enantiômero R e é responsável por cerca de 70% de toda atividade anticoagulante (Ufer, 2005). Os cumarínicos utilizados como medicamentos são compostos por uma mistura racêmica de ambos enantiômeros.

## **1.2. FARMACOLOGIA DOS CUMARÍNICOS**

### ***1.2.1. Farmacocinética***

Na ausência de patologias, a varfarina oral é 100% absorvida. Após a absorção, 98% a 99% da varfarina liga-se a proteínas plasmáticas, especialmente albumina (Gage *et al.*, 2008a).

A isoenzima 2C9 da família do citocromo P450 é a catalisadora predominante responsável pelo metabolismo da forma enantiomérica mais ativa das cumarinas, que é o enantiômero S (Figura 1). Esta enzima pertence a um grupo de monoxigenases de heme-tiolato localizada no retículo endoplasmático. É expressa predominantemente no fígado, mas também está presente em outros órgãos como intestino, pulmões, rins e placenta (Slaughter *et al.*, 1995). No fígado, está envolvida com uma rota transportadora de elétrons NADPH-dependente. A isoenzima 2C9 contribui para a variabilidade

do metabolismo de vários fármacos tais como: S-varfarina, S-femprocumona, diclofenaco, fenitoína, tolbutamida e losartana (Lal *et al.*, 2006).

O CYP2C9 é responsável por catalisar a hidroxilação da varfarina, da femprocumona e do acenocumarol. Entretanto, a importância relativa do CYP2C9 no *clearance* de cada anticoagulante difere substancialmente. Ele exerce um papel importante no *clearance* da varfarina e do acenocumarol, com uma menor contribuição na metabolização da femprocumona. Na metabolização da varfarina, o CYP2C9 faz a conversão do enantiômero S-varfarina a 6- e 7-hidroxiwarfarina sendo, assim, excretado na bile (Redman, 2001).

A menor importância do CYP2C9 para o *clearance* de femprocumona deve-se ao envolvimento do CYP3A4 como catalisador principal da hidroxilação de femprocumona. Além disso, a femprocumona não metabolizada é excretada na bile e urina, enquanto que a eliminação de varfarina e acenocumarol é quase que completamente feita por metabolização. Consequentemente, os efeitos dos polimorfismos do *CYP2C9* na farmacocinética e na resposta anticoagulante são também menos pronunciadas no caso de femprocumona, que parece ser o fármaco preferido para pacientes com fenótipo metabolizador lento do CYP2C9 (Ufer, 2005).

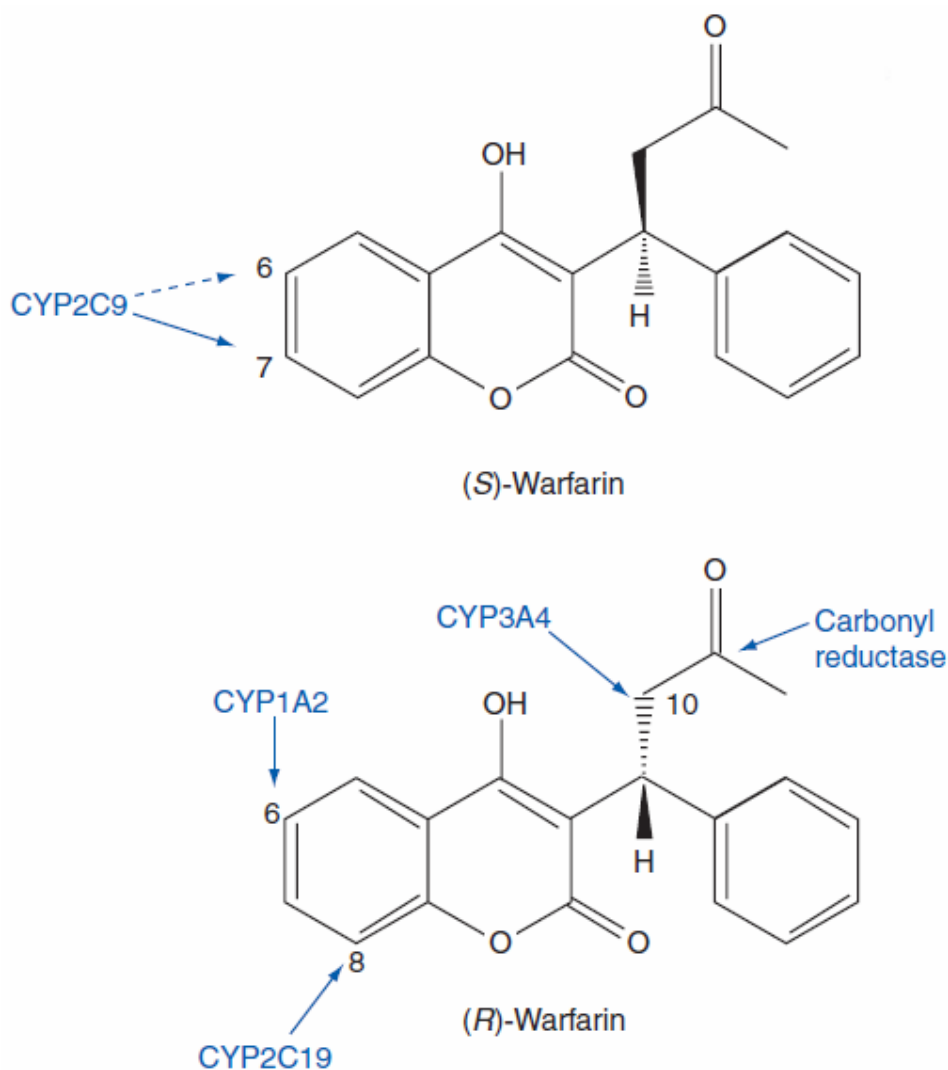


Figura 1. Enzimas envolvidas no metabolismo da varfarina em humanos (Rettie & Tai, 2006).

### 1.2.2. Farmacodinâmica

As cumarinas exercem o seu efeito anticoagulante interferindo na regeneração da vitamina K (Figura 2) através da inibição da enzima vitamina K epóxido redutase, levando à inibição da  $\gamma$ -carboxilação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X) e também de inibidores fisiológicos da coagulação (proteína C e proteína S).



O sistema de  $\gamma$ -carboxilação modifica as proteínas dependentes de vitamina K pós-tradução, adicionando um grupo carboxil a um carbono  $\gamma$  de um resíduo específico de ácido glutâmico. Essa modificação converte o resíduo de ácido glutâmico à  $\gamma$ -carboxiglutâmico, no qual ocorre a ligação de cálcio (Suttie, 1985). A ligação do cálcio é essencial para que as proteínas pró-coagulantes desempenhem sua função fisiológica.

A vitamina K na forma reduzida (hidroquinona) atua como cofator da enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase (GGCX) na reação de carboxilação dos fatores de coagulação. Ao atuar nessa reação, a vitamina K passa de sua forma ativa reduzida para sua forma inativa oxidada (vitamina K 2,3-epóxi). A enzima vitamina K epóxido redutase (VKOR), presente no fígado, catalisa a reação de reciclagem da vitamina K 2,3-epóxi para hidroquinona. O efeito do anticoagulante cumarínico não é imediato em decorrência do tempo levado para a degradação dos fatores carboxilados presentes no plasma; sua ação somente é observada dentro de 2 dias após sua administração. O fator VII, com a menor meia-vida (6 horas) é o primeiro a ser afetado, seguido pelos fatores IX, X e II, que possuem meias-vidas de 24, 40 e 60 horas, respectivamente.

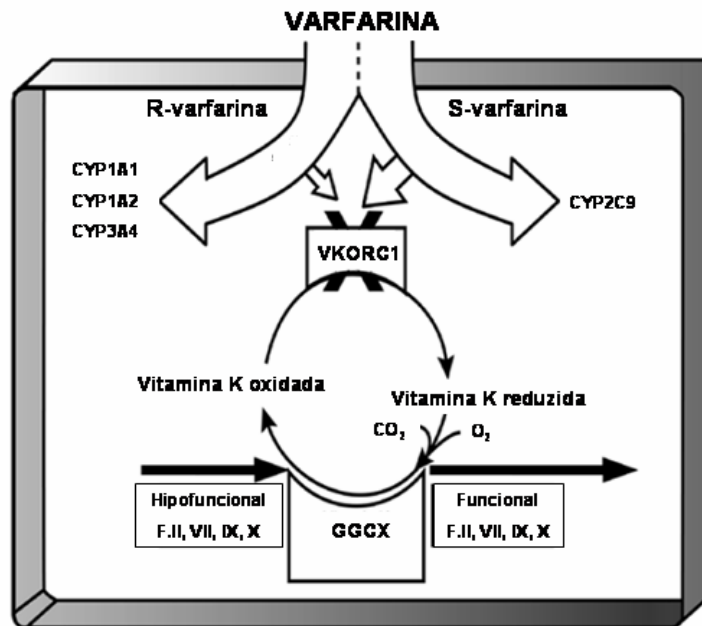


Figura 2. Ciclo da vitamina K. A varfarina inibe a redução da vitamina K, impedindo que ela atue junto à  $\gamma$ -glutamil carboxilase (GGCX) na carboxilação dos fatores de coagulação (adaptado de Gage, 2006).

O monitoramento da anticoagulação é realizado pelo tempo de protrombina, sendo o resultado expresso pelo INR (relação normalizada internacional). O INR de um indivíduo que não faz uso de anticoagulante costuma ser próximo de 1 e após o início da anticoagulação o valor tende a subir, sendo assim, quanto maior o INR mais anticoagulado está o paciente. A recomendação de um INR entre 2 e 3 é feita para a maioria das indicações (Tabela 1). As exceções são alguns tipos de próteses mecânicas de válvula cardíaca, pós-infarto do miocárdio e certos casos de trombose e síndrome antifosfolípido, para as quais costuma-se recomendar um INR alvo de 2,5-3,5 (Hirsh *et al.*, 2001).

Tabela 1. Alvos de INR recomendados para a terapia com anticoagulante oral (adaptado de Hirsh *et al.*, 2001).

INDICAÇÃO	INR
Profilaxia de trombose venosa	
Tratamento de trombose venosa	
Tratamento de embolia pulmonar	
Prevenção de embolia sistêmica	2,0 – 3,0
Válvula cardíaca de tecido	
Pós-infarto do miocárdio (prevenção de embolia sistêmica)*	
Doença cardíaca valvar	
Fibrilação atrial	
Prótese de válvula mecânica (alto risco – mitral)	2,5 – 3,5
Prótese de válvula mecânica bileaflet na posição aórtica	2,0 – 3,0

\*Se a terapia foi eleita para prevenir infarto do miocárdio recorrente, é recomendado um INR de 2,5 – 3,5, consistente com as recomendações do FDA.

### 1.3. VARIABILIDADE À SENSIBILIDADE AOS CUMARÍNICOS

Há mais de cinquenta anos, a dose de varfarina vem sendo indicada por tentativa e erro, na qual a dose inicial (2-10 mg) é baseada na indicação ou em fatores intrínsecos e extrínsecos. A manutenção da dose tem sido feita através do ajuste da dose inicial baseada na resposta observada através do INR. A dose para se obter o INR alvo varia na população em uma média de 4 mg a 80 mg semanais (Gage *et al.*, 2008a).

A baixa dose de cumarínico pode estar associada a diversos fatores como idade avançada, peso corporal baixo, eurodescendentes (comparado a

afrodescendentes), concentração de albumina plasmática baixa, uso de tabaco, baixos INRs alvos, doenças hepáticas, insuficiência cardíaca, alguns medicamentos, falta de exercícios físicos e uma dieta com baixo aporte de vitamina K (Gage *et al.*, 2004). Pacientes mais idosos requerem uma menor dose de anticoagulantes orais, que poderia ser explicado pela diminuição do *clearance* do medicamento (Shepherd *et al.*, 1977; Gurwitz *et al.*, 1992; Loebstein *et al.*, 2001). A área de superfície corporal (BSA – do inglês, *body surface area*) correlaciona-se com a dose de varfarina, provavelmente porque ela está correlacionada com o tamanho do fígado e, conseqüentemente, com o *clearance* hepático dos cumarínicos (Wynne *et al.*, 1995).

Alguns fármacos também desenvolvem um importante papel na variação de dose desses anticoagulantes através de interações medicamentosas. Vários estudos demonstraram um aumento significativo (10-30%) no efeito da varfarina quando seu uso é feito concomitante à sinvastatina. O mecanismo de interação desses medicamentos ainda não está esclarecido. É sugerido que a interação deve-se à diminuição da eliminação de varfarina (Westergren *et al.*, 2007) que ocorre devido à inibição das enzimas CYP2C9 e CYP3A4 do citocromo P450, responsáveis pelo metabolismo da S- e R-varfarina, respectivamente (Sconce *et al.*, 2006). Outra hipótese argumenta que a diminuição dos níveis lipídicos causada pela sinvastatina, diminui a concentração de vitamina K no plasma (Hickmott *et al.*, 2003), já que ela tem seu transporte feito através da apolipoproteína E. Outro fármaco que interage com a varfarina é a amiodarona. Pacientes que utilizam os dois fármacos concomitantemente apresentam uma redução do *clearance* de varfarina e aumento de sua fração livre no plasma, resultando em uma potenciação do efeito da varfarina, aumento do INR e maior

risco de hemorragia. A base dessa interação é a inibição de enzimas do citocromo P450, incluindo o CYP2C9 (Heimark *et al.*, 1992).

Além dos fatores ambientais, fatores genéticos também estão associados à variação de dose de cumarínicos determinando a ocorrência de grupos de indivíduos com perfis farmacocinético e farmacodinâmico diferentes para essa classe medicamentosa.

### **1.3.1. Variabilidade genética**

O conhecimento da farmacogenética dos cumarínicos pode auxiliar os médicos a predizerem a dose terapêutica de cada paciente, diminuindo assim, o risco de hemorragia durante o início do tratamento (Gage *et al.*, 2004).

A variabilidade genética em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos cumarínicos é responsável por parte das diferenças interpopulacionais e interindividuais observadas. Considerando o metabolismo e o modo de ação dos cumarínicos, pelo menos 30 genes podem estar envolvidos no mecanismo pelo qual os cumarínicos exercem seu efeito anticoagulante (Wadelius *et al.*, 2007a).

Conforme descrito no item anterior, a enzima codificada por *CYP2C9* é a mais importante envolvida na farmacocinética dos cumarínicos, especialmente da varfarina, portanto, o gene que codifica esta enzima foi um dos primeiros genes investigados. Enquanto que o principal gene envolvido na farmacodinâmica é o *VKORC1*, que codifica a enzima alvo dos cumarínicos, a vitamina K epóxido redutase. Ambos os genes têm sido bastante estudados com relação ao seu papel na dose dos cumarínicos.

Os genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1*, juntamente com fatores ambientais, explicam apenas dois terços da variabilidade interindividual de resposta à varfarina (Sconce *et al.*, 2005; Wadelius *et al.*, 2005). Isto sugere que outros fatores genéticos também possam contribuir para a variabilidade desse medicamento. Dessa forma, a possibilidade do envolvimento de outros genes tem sido investigada. Genes como calumenina (*CALU*) (Wajih *et al.*, 2004; Vecsler *et al.*, 2006; Gonzales-Conejero *et al.*, 2007), epóxido hidrolase microssomal (*EPHX1*) (Loebstein *et al.*, 2005),  $\gamma$ -glutamil carboxilase (*GGCX*) (Chen *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2007), fator II (*F2*) (Shikata *et al.*, 2004; D'Ambrosio *et al.*, 2004), fator VII (*F7*) (Shikata *et al.*, 2004; D'Ambrosio *et al.*, 2004), apolipoproteína E (*APOE*) (Visser *et al.*, 2005) e proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1/MDR1*) (Wadelius *et al.*, 2004) podem ter influência na dose de anticoagulantes cumarínicos.

No trabalho realizado por Wadelius *et al.* (2007b) foram investigados 29 genes e os resultados obtidos mostraram que os genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *PROC* e *APOE* estão associados com a dose de varfarina. Porém, os genes do *CYP2C9* e *VKORC1* eram os principais determinantes da dose. Um estudo de associação genômica total (GWAS) realizado recentemente demonstrou que o gene *CYP4F2* também é um importante determinante da dose de varfarina (Takeuchi *et al.*, 2009). Além de encontrar associação deste gene, o estudo confirmou a associação dos genes *CYP2C9* e *VKORC1* na determinação da dose. No presente estudo foram abordados os genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* e *F2* (fator II).

### **1.3.1.1. Gene CYP2C9**

O gene do *CYP2C9* tem aproximadamente 55 kb e está localizado no cromossomo 10q24.2 (Meehan *et al.*, 1988; Goldstein *et al.*, 1994). Já foram identificadas mais de 20 variações não sinônimas no gene. Polimorfismos no *CP2C9* resultam em enzimas com cinética diferente, estando associados, na maioria das variantes, ao decréscimo de atividade enzimática (metabolizadores lentos). *CYP2C9\*1* é a sequência referência, a mais comum e é considerada o tipo selvagem.

Várias variantes de *CYP2C9* já foram descritas, sendo que as mais estudadas com relação à dose de cumarínicos são as variantes: \*2 e \*3. Os portadores das variantes \*2 e \*3 requerem uma menor dose de cumarínicos e o risco de terem hemorragia é aproximadamente o dobro comparado aos homocigotos para o alelo selvagem. O estudo realizado por Ufer *et al.* (2004) mostrou que portadores das variantes \*2 ou \*3 apresentam uma concentração dos metabólitos de femprocumona significativamente menor quando comparados a portadores do alelo \*1. Outro estudo, realizado por Kirchheiner *et al.* (2004) em voluntários sadios não encontrou um efeito significativo dos alelos \*2 e \*3 nos parâmetros farmacocinéticos da R-femprocumona, porém, o *clearance* da S-femprocumona tende a diminuir com o aumento do número dos alelos *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3*.

As principais variantes do gene *CYP2C9* serão caracterizadas a seguir:

### **a) Polimorfismo CYP2C9\*2 (rs1799853)**

Este polimorfismo está localizado no exon 3 do gene do *CYP2C9* e caracteriza-se pela troca de uma citosina por uma timina na posição 430 do cDNA e na posição 3608 do gene. Essa transição ocasiona uma troca do aminoácido arginina por uma cisteína na posição 144 da proteína. Indivíduos heterozigotos para o alelo 2C9\*2, quando comparados aos homozigotos para o alelo selvagem, necessitam de uma dose 14 – 30% menor de varfarina (Margaglione *et al.*, 2000; Taube *et al.*, 2000; Loebstein *et al.*, 2001), sendo essa diminuição maior quando a variante alélica 2C9\*2 está em homozigose. A diminuição de dose para pacientes que apresentam esse alelo é também observada para o uso do acenocumarol, no qual apenas 5% dos pacientes que necessitam de uma alta dose do fármaco possuem o alelo, contrastando com os 30% encontrado no grupo de pacientes que fazem uso de uma dose baixa de acenocumarol (Hermida *et al.*, 2002).

A frequência do alelo 2C9\*2 varia significativamente entre 8% a 19% em diferentes populações européias ou de ancestralidade européia. Em populações africanas ou de ancestralidade africana varia de 1 a 4% (Xie *et al.*, 2002) e em asiáticos o alelo apresenta frequência inferior a 2% (Lee *et al.*, 2006). Lima *et al.* (2008) e Perini *et al.* (2008) encontraram a frequência de 9,7% e 11,8%, respectivamente, para uma população brasileira residente no Estado do Rio de Janeiro.



## **b) Polimorfismo CYP2C9\*3 (rs1057910)**

Este polimorfismo localiza-se no exon 7 do gene do *CYP2C9* e é caracterizado pela troca de uma adenina por uma citosina na posição 1075 do cDNA que corresponde à posição 42614 do gene. Essa troca de nucleotídeos acarreta a substituição de uma isoleucina por uma leucina na posição 359 da cadeia protéica.

Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, os quais demonstraram que o alelo *CYP2C9\*3* causa uma perda da atividade enzimática. Consequentemente, para que se tenha o efeito desejado, é necessária a redução de 21 – 49% da dose de varfarina (Margaglione *et al.*, 2000; Taube *et al.*, 2000; Loebstein *et al.*, 2001; Sanderson *et al.*, 2005). Um estudo realizado com pacientes fazendo uso de acenocumarol mostrou que 80% dos portadores de pelo menos um alelo *2C9\*3* necessitam de uma dose de acenocumarol muito menor (Hermida *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que o resíduo de aminoácido 359 é um componente do sítio de ligação da varfarina (Gotoh, 1992; Kaminsky *et al.*, 1993), motivo esse que leva à diminuição da atividade da enzima.

Europeus e seus descendentes apresentam uma significativa heterogeneidade na frequência desse polimorfismo, variando entre 3% a 16%. Nas populações africanas ou de ancestralidade africana esse alelo está presente entre 1% a 2% e na população asiática varia entre 1% e 3% (Xie *et al.*, 2002).

Diversos trabalhos investigaram a relação entre os polimorfismos do *CYP2C9* e a dose de cumarínicos em diferentes populações. Alguns desses resultados estão mostrados na Tabela 2. Lima *et al.* (2008) demonstraram em uma população brasileira que pacientes com o alelo 2C9\*2 ou 2C9\*3 apresentam maior risco de super anticoagulação comparado a pacientes 2C9\*1/\*1 e poderiam ser beneficiados com uma diminuição da dose inicial do tratamento. Perini *et al.* (2008) mostraram o mesmo efeito desses alelos em outra amostra da mesma população.

Como pode ser observado na Tabela 2, com relação ao polimorfismo *CYP2C9*\*2, dos 10 estudos mostrados, em apenas 3 não foi encontrada associação desta variante com a dose de varfarina. Quanto ao alelo *CYP2C9*\*3, todos os trabalhos relatam associação com a dose de varfarina. Nos trabalhos onde foi encontrada associação, os resultados obtidos mostram que indivíduos portadores dos alelos \*2 ou \*3 necessitam de doses significativamente menores de varfarina para alcançar o INR terapêutico.

Com relação à influência dos polimorfismos do gene *CYP2C9* na dose de femprocumona, os resultados são contraditórios. No trabalho realizado por Hummers-Pradier *et al.* (2003), na Alemanha, não foi encontrada associação. Entretanto, no trabalho de Schalekamp *et al.* (2004) foi verificada associação com os alelos *CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3, sendo que os indivíduos heterozigotos para os alelos \*2 ou \*3 necessitavam de dose menor de femprocumona do que os homozigotos para o alelo \*1. Isso pode ser explicado pela menor contribuição do *CYP2C9* na metabolização da femprocumona.

Tabela 2. Resultados encontrados em estudos feitos com polimorfismos do gene *CYP2C9* em relação à dose de varfarina.

Alelo	População	N	Associação com a dose	Decréscimo de dose para heterozigoto	Referência
CYP2C9*2	Reino Unido	683	Sim, P=0,001	14,0%	Taube <i>et al.</i> (2000)
	EUA	56	Sim, P=0,017	28,6%	Linder <i>et al.</i> (2002)
	Reino Unido	121	Sim, P<0,005	10,6%	Kamali <i>et al.</i> (2004)
	EUA	369	Sim, P<0,0001	19,0%	Gage <i>et al.</i> (2004)
	Reino Unido	297	Sim, P=0,02	12,7%	Sconce <i>et al.</i> (2005)
	Itália	147	Sim, P<0,05	21,7%	D'Andrea <i>et al.</i> (2005)
	Canadá	189	Não	8,1%	Moridani <i>et al.</i> (2006)
	Israel	119	Não	7,5%	Muszkat <i>et al.</i> (2007)
	Brasil	103	Não	1,9%	Lima <i>et al.</i> (2008)
	Brasil	390	Sim, P<0,0001	23,0%	Perini <i>et al.</i> (2008)
CYP2C9*3	Reino Unido	683	Sim, P=0,001	20,8%	Taube <i>et al.</i> (2000)
	EUA	56	Sim, P<0,001	57,1%	Linder <i>et al.</i> (2002)
	EUA	369	Sim, P<0,0001	30,0%	Gage <i>et al.</i> (2004)
	Reino Unido	121	Sim, P<0,005	33,5%	Kamali <i>et al.</i> (2004)
	Itália	147	Sim, P<0,05	36,7%	D'Andrea <i>et al.</i> (2005)
	Reino Unido	297	Sim, P=0,001	33,8%	Sconce <i>et al.</i> (2005)
	Japão	93	Sim, P=0,015	29,1%	Kimura <i>et al.</i> (2007)
	Canadá	189	Sim, P<0,05	19,4%	Moridani <i>et al.</i> (2006)
	Japão	828	Sim, P=0,00039	20,0%	Mushiroda <i>et al.</i> (2006)
	Coréia	108	Sim, P<0,001	37,2%	Cho <i>et al.</i> (2007)
	Israel	119	Sim, P=0,008	33,0%	Muszkat <i>et al.</i> (2007)
	Brasil	103	Sim, P=0,001	37,0%	Lima <i>et al.</i> (2008)
		Brasil	390	Sim, P=0,005	15,4%

### **1.3.1.2. Gene VKORC1**

Como já mencionado, os cumarínicos atuam inibindo a enzima vitamina K epóxido redutase (VKOR) que é codificada pelo gene da subunidade 1 do complexo da vitamina K epóxido redutase (*VKORC1*).

O gene *VKORC1* foi identificado por 2 grupos independentes (Rost *et al.*, 2004 e Li *et al.*, 2004). Este gene localiza-se no cromossomo 16p11.2, tem aproximadamente 4 kb de comprimento, 3 exons e codifica uma proteína de 163 resíduos. Mutações no gene *VKORC1* têm sido descritas em pacientes com “Deficiência Combinada dos Fatores de Coagulação Dependentes de Vitamina K Tipo 2”, uma doença hemorrágica autossômica recessiva (Rost *et al.*, 2004). O gene *VKORC1* apresenta vários polimorfismos descritos, sendo que alguns estão associados com a variação na dose de cumarínicos utilizada. A seguir, serão detalhados os polimorfismos que desempenham um papel importante na dose dos cumarínicos.

#### **a) Polimorfismo *VKORC1* -1639G>A (rs9923231)**

Este polimorfismo localiza-se na região promotora do gene, no segundo nucleotídeo de uma E-Box (CANNTG). A troca do A para o G pode abolir a sequência consenso da E-Box, levando a uma possível mudança na atividade promotora. Os estudos de expressão *in vitro* deste polimorfismo apresentam resultados divergentes. Yuan *et al.* (2005) demonstraram que o promotor contendo o alelo G tem um aumento de aproximadamente 44% na sua atividade quando comparado com o promotor contendo o alelo A. Porém, nos

estudos de expressão realizados por Bodin *et al.* (2005) ambos alelos apresentavam atividade promotora similar.

Entretanto, Rieder *et al.* (2005), estudando tecido hepático, demonstraram que existe correlação entre os haplótipos do *VKORC1* e a produção de mRNA. As amostras homozigotas para o haplótipo B produziram maior quantidade de mRNA do *VKORC1* do que as amostras homozigotas para o haplótipo A, e as heterozigotas produziam um nível intermediário. Neste trabalho, os haplótipos foram construídos utilizando 10 diferentes polimorfismos do *VKORC1*, sendo que o haplótipo B contém o alelo G para o polimorfismo -1639. Wang *et al.* (2008) revelaram uma relação do alelo -1639G com a cromatina ativa, consistente com a expressão aumentada de mRNA.

Vários trabalhos relataram associação deste polimorfismo com a dose de varfarina em diferentes populações. O trabalho de Sconce *et al.* (2005), realizado na Inglaterra, mostrou que indivíduos homozigotos AA necessitam de dose menor de varfarina do que heterozigotos ou homozigotos GG. Resultados similares ao de Sconce *et al.* (2005) foram encontrados por Yuan *et al.* (2005) na população chinesa e por Kimura *et al.* (2007) e Yoshizawa *et al.* (2009) na população japonesa. Perini *et al.* (2008) demonstraram na população brasileira que a dose semanal de varfarina decresce do genótipo -1639GG para o GA e AA.

Diante da observação de que os níveis de vitamina K oxidada são menores em pacientes recebendo suplemento de vitamina K com o genótipo -1639GG do que para pacientes com outros genótipos, foi concluído por Sconce *et al.* (2008) que a vitamina K é reduzida pelo VKOR mais eficientemente quando o genótipo do *VKORC1* é o -1639GG. Esses dados sugerem que a

suplementação com vitamina K leva a uma melhor regeneração da vitamina K reduzida e, desta forma, a um aumento da carboxilação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K quando o genótipo do indivíduo é -1639GG. Em consequência, a dose de varfarina necessária em portadores desse genótipo aumenta em aproximadamente 25%.

Em um estudo realizado com o acenocumarol, Bodin *et al.* (2005) encontraram que 37% da variação do nível de fator VII e 30% da variação do INR devem-se ao polimorfismo -1639G>A, sendo que os portadores do alelo -1639G apresentam um menor decréscimo de fator VII e menor aumento de INR.

A frequência desse polimorfismo difere muito entre etnias. Em populações européias ou de ascendência européia o alelo -1639A tem uma frequência de aproximadamente 37% na população, enquanto que na população chinesa esse mesmo alelo ocorre com uma frequência aproximada de 91% (Yuan *et al.*, 2005). Em uma população brasileira do Rio de Janeiro, Perini *et al.* (2008) encontraram uma frequência de 38% para o alelo -1639A.

#### **b) Polimorfismo *VKORC1* 1173C>T (rs9934438)**

Este polimorfismo localiza-se no intron 1 do gene *VKORC1* e, conforme os dados obtidos por D'Andrea *et al.* (2005), não tem efeito no processamento do mRNA. Apesar de não apresentar um efeito funcional, alguns trabalhos investigaram a relação deste polimorfismo com a dose de varfarina. O trabalho realizado na população italiana por D'Andrea *et al.* (2005) mostrou que indivíduos portadores do alelo 1173C necessitam de doses maiores de

varfarina do que indivíduos homozigotos TT. Resultados similares também foram descritos por Kimura *et al.* (2007) na população japonesa e por Cho *et al.* (2007) na população coreana.

Com relação ao uso de femprocumona, o trabalho realizado por Reitsma *et al.* (2005) na Holanda também relatou associação do polimorfismo *VKORC1* 1173C>T com a dose deste cumarínico, sendo o efeito similar ao descrito para a varfarina.

Talvez, o motivo pelo qual vários estudos observaram associação dessa variante com a diferenciação na dose de varfarina se deve ao desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -1639G>A (o alelo -1639A segrega com o alelo 1173T), descrito por Sconce *et al.* (2005).

A frequência do alelo T varia entre os diferentes grupos étnicos. Em populações européias ou com ancestralidade européia é de aproximadamente 40%, em asiáticos é de 90% e em afro-descendentes é de 8% (D'Andrea *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2006).

### **c) Polimorfismo *VKORC1* 3730G>A (rs7294)**

Este polimorfismo localiza-se na região 3' não-traduzida (UTR) do gene (Yuan *et al.*, 2005), podendo ocasionar alteração na estabilidade do mRNA, modificando, assim, a expressão gênica.

Os trabalhos realizados por D'Andrea *et al.* (2005) e por Kimura *et al.* (2007) nas populações italiana e japonesa, respectivamente, encontraram associação entre a dose de varfarina e este polimorfismo. Em ambos os

trabalhos, indivíduos homozigotos 3730GG necessitavam de doses menores de varfarina do que heterozigotos ou homozigotos 3730AA.

Kosaki *et al.* (2006) encontraram completo desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos 3730G>A e 1173C>T na população japonesa. O alelo 3730G estaria segregando junto com o alelo 1173T.

No Japão, a frequência do alelo A é de 8% (Kimura *et al.*, 2007), na Itália é de 34% (D'Andrea *et al.*, 2005) e em afro-descendentes é de 52% (Takahashi *et al.*, 2006).

Alguns estudos estão sendo realizados ao nível de haplótipos, como fizeram Rieder *et al.* (2005), no qual foram encontrados nove haplótipos considerando as posições 381, 861, 2653, 3673, 5808, 6009, 6484, 6853, 7566 e 9041 (número de acesso no GenBank: AY587020) do DNA do gene do *VKORC1*, sendo que as posições 3673 e 6484 se referem aos polimorfismos -1639A>G e 1173C>T (considerando a sequência numérica do cDNA). Nesse estudo foi identificado que o grupo A dos haplótipos (haplótipos 1 e 2, ambos contendo os alelos -1639A e 1173T) está associado com baixas doses de varfarina, enquanto que os haplótipos 7 e 9 (pertencentes ao grupo B, portadores dos alelos -1639G e 1173C) estariam associados com uma dose aumentada de varfarina. Na população húngara, Sipeky *et al.* (2008) demonstraram que a dose de varfarina decresce nos pacientes homozigotos para o grupo haplotípico A ( $2,7 \pm 0,2$  mg/dia), sendo intermediária em pacientes portadores dos dois grupos haplotípicos ( $4,9 \pm 0,2$  mg/dia) e apresentando a maior dose no grupo homozigoto para o grupo haplotípico B ( $6,2 \pm 0,3$  mg/dia).



A baixa frequência dos alelos -1639A e 1173T (haplótipo A, cujo portador necessita de doses menores de varfarina) nos africanos parece ser a causa da maior média de dose do medicamento requerida por este grupo étnico quando comparado a europeus e seus descendentes e a asiáticos (Marsh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Limdi *et al.* (2008) encontraram uma frequência de 10,6% do haplótipo A em afrodescendentes comparado com 35% em eurodescendentes.

### **1.3.1.3. Gene CYP4F2**

O CYP4F2 participa da rota de inativação da vitamina E (Sontag *et al.*, 2002). Considerando a similaridade entre as vitaminas E e K, o CYP4F2 é capaz de oxidar a vitamina K através da hidroxilação de sua cadeia lateral fitil, interferindo, assim, na reciclagem da vitamina K (McDonald *et al.*, 2009). Dessa forma, alguns estudos demonstraram que o gene *CYP4F2* apresenta um efeito funcional nas doses de varfarina (Caldwell *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2009) e acenocumarol (Perez-Andreu *et al.*, 2009). Esta associação foi corroborada por uma associação genômica total realizada por Takeuchi *et al.* (2009).

#### **a) Polimorfismo 1347C>T (rs2108622)**

O polimorfismo 1347C>T leva à substituição do aminoácido valina por uma metionina na posição 433 da proteína CYP4F2 (Glurich *et al.*, 2008). Pacientes TT necessitam de uma dose de aproximadamente 1 mg/dia superior

em relação a pacientes CC (Caldwell *et al.*, 2008), o que significa um aumento de 4-12% na dose por alelo T. Perez-Andreu *et al.* (2009) relacionaram o alelo 1347C com o decréscimo dos níveis de fator II, fator VII, fator IX e fator X no início do tratamento com acenocumarol. A frequência do alelo 1347T é de aproximadamente 30% em eurodescendentes e asiáticos, enquanto que em africanos e em afrodescendentes é de aproximadamente 7% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>). Devido a menor frequência do alelo T, é provável que na população africana e afrodescendente esta variante apresente menor contribuição para predizer a dose de varfarina.

#### **1.3.1.4. Gene do Fator II**

A trombina é a serina protease central da cascata de coagulação sanguínea que converte fibrinogênio a fibrina. Ela é gerada a partir do fator II, ou protrombina, pela ação do fator Xa com seus cofatores cálcio, fosfolípídeo e fator Va (Figura 3). O fator II é um fator de coagulação dependente da gama-carboxilação. Assim, torna-se hipofuncional após a ação da varfarina. O gene *F2* está localizado no cromossomo 11p11-q12 (Royle *et al.*, 1987) e possui um tamanho de aproximadamente 19 kb distribuídos em 14 exons.

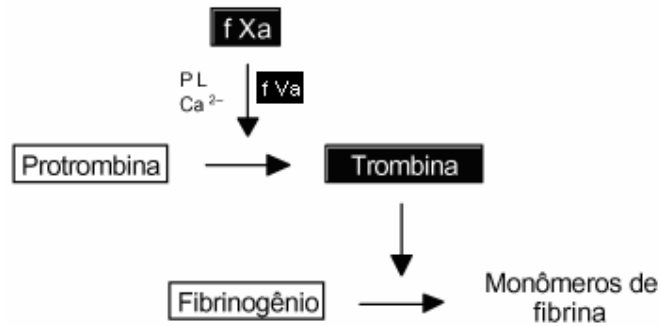


Figura 3. Esquema simplificado da atuação da protrombina na cascata de coagulação. Os zimogênios estão nas caixas brancas e os fatores ativados estão em preto.

#### a) Polimorfismo 494C>T (rs5896)

O polimorfismo 494C>T, localizado no exon 6 do gene, tem se mostrado relacionado com a dose de varfarina. Essa transição ocasiona a troca de uma treonina por uma metionina no resíduo 165 da proteína. Portadores do alelo T necessitam de uma dose de varfarina inferior quando comparados aos homozigotos para o alelo C (D'Ambrosio *et al.*, 2004; Shikata *et al.*, 2004). A frequência do alelo 494T é de aproximadamente 10% em populações eurodescendentes (D'Ambrosio *et al.*, 2004) e de 38% em asiáticos (Shikata *et al.*, 2004).

### 1.4. APLICAÇÃO CLÍNICA

Com o objetivo de diminuir os episódios de toxicidade da varfarina, foram propostos alguns modelos de algoritmos clínicos, porém, esses algoritmos possuem algumas falhas. A maior barreira para seu uso é que eles foram desenvolvidos para pacientes de meia-idade que podem tolerar doses

diárias de 5 mg a 10 mg de varfarina e que realizam o monitoramento do INR diariamente (Fennerty *et al.*, 1984; Harrison *et al.*, 1997). O típico paciente usuário de cumarínico é o idoso. Tendo em vista que a dose recomendada de varfarina decresce com a idade (Gurwitz *et al.*, 1992; Loebstein *et al.*, 2001), a utilização desses algoritmos tende a causar sobredosagem nos pacientes idosos (Oates *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999; Gedge *et al.*, 2000; O'Connell *et al.*, 2000). Um segundo fator que aumenta o risco de sobredosagem é que muitos pacientes iniciam o tratamento com varfarina sem que seja possível monitorar o INR diariamente. Um terceiro empecilho é que esses algoritmos são empíricos, assim, confiam na dose de tentativa e erro preferencialmente à dose baseada em fatores individuais genéticos e clínicos (Ageno *et al.*, 2005).

Novos algoritmos que incorporam fatores clínicos e farmacogenéticos para estimarem a dose de varfarina vêm sendo desenvolvidos. Médicos poderão fazer uso dessa metodologia para predizer a melhor dose para cada paciente, evitando assim, risco de sobredosagem e consequente hemorragia.

Um dos primeiros algoritmos farmacogenéticos foi elaborado por Sconce *et al.* (2005). O modelo foi baseado em 297 pacientes do Reino Unido com dose estável de varfarina. Todos os pacientes eram eurodescendentes e tinham um INR alvo entre 2-3. A equação que melhor estimou a dose levou em conta os seguintes fatores: idade, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, VKORC1 -1639G>A e altura. Hatch *et al.* (2008) testaram este algoritmo em uma amostra independente de pacientes da mesma população com dose estável de varfarina. As doses obtidas através do algoritmo foram bastante similares às doses já utilizadas pelos pacientes, demonstrando que essa ferramenta tem uma grande eficácia na estimativa de dose de varfarina na população testada.

Perini *et al.* (2008) desenvolveram um algoritmo baseado na população brasileira que explica 50,4% da variação semanal de dose de varfarina considerando um maior número de fatores. A equação de regressão proposta incluiu fatores como idade, peso, prótese de válvula cardíaca, doença tromboembólica, sinvastatina, amiodarona, *CYP2C9* (\*2, \*3, \*5 e \*11) e *VKORC1* -1639G>A. O mesmo grupo desenvolveu posteriormente um outro modelo considerando as mesmas variáveis, mas excluindo alguns pacientes que estavam no primeiro modelo. Esta nova equação explicou 55% da variação de dose do anticoagulante. Além disso, ao incluir o polimorfismo 1347C>T do gene *CYP4F2*, o modelo explicou 1% a mais da variação (Perini *et al.*, 2010).

Em 16 de agosto de 2007, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a nova bula da varfarina. Nela, deve vir a recomendação, mas não obrigação, da realização de testes moleculares para a detecção das variantes genéticas do *CYP2C9* e do *VKORC1* para que sejam evitadas as graves reações adversas ocasionadas por esse medicamento em alguns pacientes (Gage *et al.*, 2008a). Porém, para a aplicação dos resultados dos testes, cada população deverá desenvolver o seu algoritmo específico (Thompson, 2007), devido à grande diferença nas frequências gênicas dessas variantes entre as etnias.

Estudos com o objetivo de validar os algoritmos já descritos vêm sendo realizados de forma retrospectiva e prospectiva para que se analise sua eficácia clínica (Lenzini *et al.*, 2008; Wadelius *et al.*, 2009; Lubitz *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2010). Os resultados apontam para a necessidade de se desenvolver algoritmos população-específicos, pois os modelos testados em populações diferentes da população em que o algoritmo se baseou apresentam

menores coeficientes de determinação do que aqueles baseados na própria população em que a equação é validada (Lubitz *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2010).

Outros polimorfismos podem ser utilizados para aprimorarem os algoritmos, como por exemplo, algumas outras variantes do *VKORC1* que causam resistência aos cumarínicos (Rost *et al.*, 2004). Variantes de outros genes como *CYP4F2* e *F2* também têm potencial para aprimorarem estas equações.

## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

A eficácia da varfarina e de outros cumarínicos na prevenção e no tratamento de desordens tromboembólicas tem sido demonstrada em diversos ensaios clínicos e meta-análises. Entretanto, a eficácia e a segurança destes medicamentos dependem da manutenção da anticoagulação dentro de um restrito índice terapêutico. Assim, a dose necessária para alcançar a anticoagulação terapêutica é muito próxima daquela que leva ao excesso da anticoagulação. O trabalho de Jones *et al.* (2005) mostrou que os pacientes ficavam fora do INR terapêutico um terço do tempo do tratamento, sendo que 15,4% dos pacientes com valores de INR acima de 3,0 e 16,6% com valores abaixo de 2,0.

Além disso, a dose de manutenção apresenta grandes variações interindividuais, sendo que parte desta variação é ambiental (idade, sexo, alimentação, tabagismo, medicamentos) e parte é devido ao efeito de variantes genéticas, tais como os polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* e *F2*.

#### **a) Objetivo Geral**

- Propor um algoritmo – baseado na população do Rio Grande do Sul – que inclua os principais fatores genéticos e ambientais, visando aumento de eficácia e diminuição de reações adversas no tratamento com varfarina.

#### **b) Objetivos Específicos**

- Analisar a frequência dos polimorfismos já citados em uma população de pacientes anticoagulados do Rio Grande do Sul.



- Analisar a relevância que cada gene independentemente apresenta na farmacoterapia com a varfarina;
- Analisar a interação das variantes dos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* e *F2*, assim como deles com o ambiente, na sua relação com a dose de varfarina.

## **CAPÍTULO 3**

### **Influence of genetic and non-genetic factors on warfarin response: an algorithm for dose prediction in a Southern Brazilian population**

---

Manuscrito em preparação

**Influence of genetic and non-genetic factors on warfarin response: an algorithm for dose prediction in a Southern Brazilian population**

Mariana R. Botton<sup>1</sup>, Eliane Bandinelli<sup>1</sup>, Luis E. P. Rohde<sup>2</sup>, Luis C. Amon<sup>3</sup>, Mara H. Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>2</sup>Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>3</sup>Serviço de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

Short title: Warfarin dose prediction in a Southern Brazilian population

**Address to which proofs should be sent:**

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel: 55 51 3316-6720  
Fax: 55 51 3316-7311  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## **Abstract**

We investigated the influence of the CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 polymorphisms in CYP2C9 gene, -1639G>A, 1173C>T and 3730G>A in the VKORC1 gene, 1347C>T in the CYP4F2 gene and 494C>T in the F2 gene with warfarin dose/response independently, in addition, a model including genetic and nongenetic factors able to predict warfarin dose needed for each patient was developed. The analysis was performed with 279 patients of European ancestry taking warfarin. The CYP2C9\*2 (P <0.001) and CYP2C9\*3 (P <0.001) polymorphisms in the CYP2C9 gene, -1639G>A (P <0.001) and 1173C>T (P <0.001) in VKORC1 gene and 494C>T in F2 gene are responsible for lower anticoagulant doses. In contrast, the SNPs 1347C>T in the CYP4F2 gene and 3730G>A (P <0.001) in VKORC1 gene are responsible for higher doses of warfarin. An algorithm considering these polymorphisms and some clinical variables was developed and explains 63.3% of the variation in warfarin dose. The model suggested is one with the higher coefficient of determination among those described in the literature, however, for a possible future clinical use it must be validated in an independent sample. More studies are warranted to find other factors that explain the 40% dose variation not explained so far.

**Key words:** CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, F2, warfarin, pharmacogenetic

## INTRODUCTION

Oral anticoagulants are extensively used at clinical practice to prevent and treat thromboembolic disorders (Hirsh *et al.*, 2001). The coumarins are the most used class of oral anticoagulants, to which warfarin belongs. The effect of this drug is influenced by several factors; its pharmacokinetics and pharmacodynamics vary with body weight, food, gender, drugs and genetic factors (Gage *et al.*, 2004). The dose to achieve the target INR ranges in the population from an average of 4 mg to 80 mg weekly (Gage *et al.*, 2008a).

SNPs in the cytochrome P450 complex (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genes affect pharmacokinetics and pharmacodynamics of coumarins, respectively, and are strongly associated with warfarin dose. CYP2C9\*2 (rs1799853) in exon 3 (430C>T, Arg144Cys) and CYP2C9\*3 (rs1057910) in exon 7 (1075A>C, Iso359Leu) are associated with change in dose, since carriers of these alleles require a lower dose of warfarin (Margaglione *et al.*, 2000; Taube *et al.*, 2000; Loebstein *et al.*, 2001). The -1639G>A (rs9923231 – at promoter) and 1173C>T (rs9934438 – at intron 1) polymorphisms in VKORC1 gene are associated with a reduction of approximately 30% of warfarin dose (Kimura *et al.*, 2007). In contrast, 3730G>A (rs7294 – 3'UTR) polymorphism, in the same gene, has been associated with an increased dose of the anticoagulant (D'Andrea *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2007). Polymorphism 1347C>T (rs2108622) in CYP4F2 (Caldwell *et al.*, 2008; Borgiani *et al.*, 2009) and 494C>T (rs5896) in F2 (D'Ambrosio *et al.*, 2004; Shikata *et al.*, 2004) have also been associated with warfarin dose. Several studies proposed different pharmacogenetic algorithms (Sconce *et al.*, 2005; Perini *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2007; Herman *et al.*, 2006; IWPC, 2009; Gage *et*

al., 2008b; Miao et al., 2007) to determine the individual dose for each patient, but until now, most of them explained up to a maximum of 60%.

The aim of this study is to propose a regression model with demographic, clinical and genetic factors to further understand warfarin dose variation. In addition, the individual influence of rs1799853, rs1057910, rs9923231, rs9934438, rs7294, rs2108622, rs5896, rs510335 and rs510317 SNPs in the weekly warfarin stable dose will be evaluated.

## **METHODS**

### **Study population**

A total of 302 patients of European ancestry recruited at the Cardiology and Internal Medicine Units from Hospital de Clínicas de Porto Alegre participated from the study. These patients were under regular use of warfarin, and attend the medical service once a month to adjust warfarin dose according to their INR target. The warfarin dose of each patient was defined as the dose in which the patient had the INR in the target for, at least, two consecutive medical visits. Those patients who remained unstable during the study period were excluded from the sample (n=23). For all patients a questionnaire was completed by an interviewer, and their medical charts were reviewed to obtain details on ancestry, medicine intake and lifestyle variables such as smoking, physical activity, and alcohol consumption, laboratory and warfarin stable dose. The Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) approval was obtained for the study and all subjects provided written informed consent to participate.

## **Laboratorial analysis**

Genomic DNA was isolated from whole blood using PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Subjects were genotyped for -1639G>A (rs9923231), 1173C>T (rs9934438) and 3730G>A (rs7294) SNPs in VKORC1 gene, CYP2C9\*2 (rs1799853) and CYP2C9\*3 (rs1057910) SNPs in CYP2C9 gene, 1347C>T (rs2108622) in CYP4F2 gene and 494C>T (rs5896) in F2 gene in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA). Standardized TaqMan assays were used for detection of -1639G>A (C\_\_30403261\_20), 1173C>T (C\_\_30204875\_10) and 3730G>A (C\_\_7473918\_10) in VKORC1 gene, CYP2C9\*2 (C\_\_25625805\_10) and CYP2C9\*3 (C\_\_27104892\_10) in CYP2C9 gene, 1347C>T (C\_\_16179493\_40) in CYP4F2 gene and 494C>T (C\_\_11381382\_20) in F2 gene. Genotyping were performed blind to clinical and demographic characteristics of patients. Determination of the INR through prothrombin time was performed at the Hematology Laboratory of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **Statistical Analysis**

Chi-square test was used to assess Hardy-Weinberg Equilibrium. The Multiple Locus Haplotype Analysis (version 3.0) (Long et al., 1995) was used to estimate linkage disequilibrium between polymorphisms in the VKORC1 gene and to derive haplotypes. The degree of linkage disequilibrium was assessed by  $D'$  and rho square ( $\rho^2$ ). The correlation between weekly warfarin dose and quantitative variables (body weight, height, BMI and age) was assessed by Spearman Correlation and differences between average warfarin weekly dose and different genotypes, as well as between average warfarin weekly dose and

utilization of some medicines, were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. All ANOVA tests, as well as multiple linear regressions, were made using the logarithm to base ten of the warfarin weekly dose because of the assumption of the test, which requires that the dependent variable is consistent with the normal distribution. To determine the variables to include in the multiple linear regression model, we performed univariate analyses to evaluate the independent influence of demographic, clinical and genetic factors in weekly warfarin dose. All variables with  $P < 0.20$  and all polymorphisms studied were included. The qualitative variables were entered into the model through dummy variables, where “0” indicates absence and “1” indicates presence of the condition. The algorithm was elaborated with factors that presented at least  $P < 0.05$  in the multiple linear regression models. Spearman correlation and mean absolute difference (AD) were used to make a comparison between the observed stable warfarin dose of our patients and the predicted dose of our algorithm. The AD for model was calculated by ( $|\text{predicted dose} - \text{observed dose}|$ ). To validate published algorithms in our population the Spearman correlation followed by  $R^2_s$  calculation was used. All statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 statistical package.

## **RESULTS**

### **Characteristics of study population**

Mean age of the 279 investigated subjects was  $62.6 \pm 14.1$  and ranged between 18 and 88 years. Most individuals were males (55.6%). The average warfarin dose in the studied sample was  $33.52 \text{mg} \pm 14.1 \text{mg}$  and ranged from 7.5 mg to 85 mg. Table 1 shows the most commonly used medicines by the



patients from this sample, along with other clinical features. About 5.4% of patients used only warfarin, 8.6% used warfarin and another drug, 6.4% used warfarin and two different drugs and the remaining used warfarin and three or more different medicines. Most common indications for oral anticoagulation were heart valve prosthesis and atrial fibrillation. The INR target of most of the patients was between 2 and 3, except in patients with heart valve mitral prosthesis, whose INR target was between 2.5 and 3.5.

### **Association between non-genetic factors and warfarin dose**

We detected a positive correlation between weekly warfarin dose and body weight ( $r_s=0.220$ ;  $P<0.001$ ), height ( $r_s=0.164$ ;  $P=0.07$ ) and BMI ( $r_s=0.137$ ;  $P=0.026$ ); negative correlation was detected between weekly warfarin dose and age ( $r_s=-0.298$ ;  $P<0.001$ ). Body weight had a stronger association with warfarin dose compared to height and BMI. Therefore we used this variable in the regression model. The medicines of prolonged use that independently influence warfarin dose were anlodipine, amiodarone,  $\beta$ -blockers, carbamazepine, loop diuretics and statins (Table 2).

### **Linkage disequilibrium and haplotypic analysis**

SNPs in the VKORC1 gene showed linkage disequilibrium ( $P<0,001$ ). The values of  $D'$  between SNPs -1639G>A x 1173C>T, -1639G>A x 3730G>A and 1173C>A x 3730G>A were 0.961, 0.971 and 0.983; values for  $\rho^2$  were 0.924, 0.362 and 0.371, respectively. The -1639A allele has higher probability to segregate with 1173T allele and 3730G allele. The 3730G>A SNP showed weaker linkage disequilibrium than the others. We obtained seven different haplotypes, but the three most frequent haplotypes (-1639G/1173C/3730A

(39.5%), -1639A/1173T/3730G (35.8%) and -1639G/1173C/3730G (23.1%) accounted for more than 98% of the chromosomes investigated.

### **Association between genetic factors and warfarin dose**

The genotype frequencies for all SNPs evaluated in this study are presented in Table 3 with their corresponding average weekly warfarin dose. The observed genotype distribution was in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium for all SNPs with exception of 1347C>T in CYP4F2 gene ( $P=0.022$ ).

The CYP2C9 polymorphisms were strongly associated with weekly warfarin dose. As shown in Table 3, individuals with CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*2/\*2, CYP2C9\*1/\*3 e CYP2C9\*2\*3 genotypes need 17.8%, 59.6%, 26.5% and 52.9% lower doses compared with homozygotes for wild type allele. All the VKORC1 polymorphisms also showed strong association with warfarin dose. Individuals with -1639GA and 1173CT genotypes and with -1639AA and 1173TT genotypes need approximately 30% and 45% lower doses, respectively, when compared to homozygotes for the wild type. In contrast, individuals with 3730GA and 3730AA genotypes need 18% and 53% higher doses when compared to individuals with the 3730GG genotype. Therefore the 3730G>A polymorphism has an opposite effect on warfarin dose compared to the other two VKORC1 SNPs. Regarding VKORC1 haplotypes, an association between diplotypes and warfarin dose ( $P<0.001$ ) was observed. Diplotypes containing GCG or GCA haplotypes are responsible for higher doses when compared with diplotypes with an ATG haplotype. Neither 1347C>T in CYP4F2 gene ( $P=0,084$ ) nor 494C>T in F2 gene ( $P=0.807$ ) were associated independently with warfarin dose in our population. However, when these polymorphisms were included in the multiple linear regression, statistically

significant results were obtained. We found that individuals with 1347CT and 1347TT genotypes for the CYP4F2 gene need higher anticoagulant doses, whereas F2 494TT genotype carriers need lower warfarin doses.

### **Algorithm for warfarin dose prediction**

The variables selected by univariate analyses ( $P < 0.20$ ) were: body weight ( $P < 0.001$ ), atrial fibrillation ( $P < 0.001$ ), mitral valve prosthesis ( $P = 0.040$ ), antiphospholipid syndrome ( $P = 0.087$ ), venous thrombosis ( $P = 0.191$ ), age ( $P < 0.001$ ), alcohol consumption ( $P = 0.172$ ), cardiopathy ( $P = 0.119$ ), systemic arterial hypertension ( $P = 0.002$ ), use of anlodipine ( $P = 0.001$ ), amiodarone ( $P = 0.001$ ),  $\beta$ -blocker ( $P = 0.006$ ), captopril ( $P = 0.175$ ), carbamazepine ( $P < 0.001$ ), digoxin ( $P = 0.058$ ), loop diuretic ( $P < 0.001$ ), statin ( $P = 0.002$ ), CYP2C9 genotype ( $P < 0.001$ ), VKORC1 haplotype/genotype ( $P < 0.001$ ), CYP4F2 genotype ( $P = 0.084$ ) and F2 genotype ( $P = 0.807$ ). Considering only the factors that were statistically significant ( $P < 0.05$ ) at multiple linear regression presented at Table 4, the algorithm that better explains the warfarin dose variation was: logarithm to base ten of warfarin weekly dose (mg) =  $1.540 - 0.003 \times (\text{age in years}) + 0.004 \times (\text{body weight in kg}) - 0.077 \times (1, \text{ if patient uses amiodarone, else } 0) + 0.198 \times (1, \text{ if patient uses carbamazepine, else } 0) - 0.047 \times (1, \text{ if patient uses } \beta\text{-blocker, else } 0) - 0.065 \times (1, \text{ if patient uses anlodipine, else } 0) - 0.037 \times (1, \text{ if patient uses loop diuretic, else } 0) - 0.129 \times (1, \text{ if patient has one CYP2C9 variant, else } 0) - 0.280 \times (1, \text{ if patient has two CYP2C9 variants, else } 0) + 0.101 \times (1, \text{ if patient has two copies of haplotype GCG, else } 0) + 0.049 \times (1, \text{ if patient has one haplotype GCA, else } 0) + 0.087 \times (1, \text{ if patient has two haplotype GCA, else } 0) - 0.105 \times (1, \text{ if patient has one haplotype ATG, else } 0) - 0.187 \times (1, \text{ if patient has two haplotype ATG, else } 0) + 0.041 \times (1, \text{ if CYP4F2 CT genotype, else } 0)$

else 0) + 0.102 x (1, if CYP4F2 TT genotype, else 0) – 0.120 x (1, if F2 494TT genotype, else 0). This algorithm can explain 63.3% of the warfarin dose variation. The clinical variable with the greatest effect was body weight and the genetic one was VKORC1 gene. When CYP4F2 and F2 genes are excluded from the model, the Adjusted R<sup>2</sup> becomes 0.604. CYP4F2 and F2 genes contribute together with 2.8% of variation in warfarin dose. Moreover, in addition to the exclusion of these two genes from the model, when we consider only the -1639G>A VKORC1 SNP instead the haplotype with 1173C>T and 3730G>A, the model explains 57.7% of the warfarin dose variation.

As shown in Figure 1, the predicted dose of our model has a good correlation with the observed dose used by patients ( $r_s=0.77$ ,  $P<0.001$ ). The mean AD (absolute difference) value for this model is 6.9 mg/week. We compared the predicted dose of other models described in the literature with the observed dose in our patients (Table 5). The published algorithms (Perini et al., 2008; Zhu et al., 2007; Herman et al., 2006; IWPC, 2009; Wadelius et al., 2009; Sconce et al., 2005; Miao et al., 2007) poorly explain warfarin dose variation in this Southern Brazilian population of European ancestry. They explain between 35% and 47% of the warfarin dose variation when applied to our population. Even an algorithm elaborated from another Brazilian sample (Perini et al., 2008) explained only 39% of variation.

## **DISCUSSION**

In this retrospective study, we investigated the influence of common SNPs in CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and F2 genes and their influence on warfarin dose variation. All allele frequencies were similar to those described in other

studies with populations from the same ethnic background (Xie *et al.*, 2002; Perini *et al.*, 2008; D'Andrea *et al.*, 2005; Perini *et al.*, 2010; D'Ambrosio *et al.*, 2004). The independent association between lower warfarin dose and CYP2C9 SNPs (Kamali *et al.* 2004, Gage *et al.* 2004, Sconce *et al.* 2005, Lima *et al.* 2008, Perini *et al.* 2008) was also observed herein. Our findings showed that homozygous individuals for the wild type allele (CYP2C9\*1/\*1) need higher doses when compared to individuals with CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*2/\*2, CYP2C9\*1/\*3 and CYP2C9\*2\*3 genotypes. As in previous studies (Sconce *et al.* 2005, Yuan *et al.* 2005, Kimura *et al.* 2007, Perini *et al.* 2008, D'Andrea *et al.* 2005, Cho *et al.* 2007), in the present study the -1639G>A and 1173C>T VKORC1 polymorphisms were also associated with lower warfarin doses. On the other hand, carriers of 3730A VKORC1 allele need higher anticoagulant doses, as reported by D'Andrea *et al.* (2005) and Kimura *et al.* (2007). In the present investigation the CYP4F2 1347C>T polymorphism was not associated with warfarin dose when analyzed independently, in contrast with some results in the literature (Caldwell *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.* 2009). However, in multivariate analyses, after controlling for covariates we observed that individuals with 1347CT and 1347TT genotypes need higher doses, in agreement with Perini *et al.* (2010) and Pautas *et al.* (2010). Results in the same direction were observed for the 494C>T in the F2 gene, D'Ambrosio *et al.* (2004) and Shikata *et al.* (2004) described an independent association between this SNP and warfarin dose. However, we corroborate their results when the analyses were controlled for covariates; carriers of the 494TT genotype need lower warfarin dose.

Our study proposed a regression model that explains 63.3% of the warfarin dose variation in a Southern Brazilian population of European ancestry. However, the model needs to be validated in an independent sample. Our algorithm includes medicines that are uncommon in other proposed algorithms, like anlodipine,  $\beta$ -blockers (atenolol, metoprolol and propranolol) and loop diuretics (furosemide and hydrochlorothiazide). The inclusion of these medicines improved the algorithm in approximately 5%. These variables have no cost, and can be easily included for dose prediction. Statins were not included due to the high correlation of this variable with age in the studied sample. However, this drug is widely known to influence warfarin dose (Hickmott et al., 2003; Westergren et al., 2007).

The inclusion of VKORC1 haplotype instead of -1639G>A SNP only improved the model in 2.8%. This effect occur mainly due to the inclusion of the 3730G>A SNP, that presents an opposite influence in warfarin dose when compared to the -1639G>A and 1173C>T SNPs. Considering genotype cost, the model with better cost-benefit for clinical use, at present, in the studied population is the one without CYP4F2 gene, F2 gene and VKORC1 haplotype presented at Table 4. The inclusion of these three variables adds only 5.6% to the model.

The factors already described in the literature are those with the main influence on oral anticoagulant doses; it is unlikely that other variables with stronger influence will be found. Taking into account that warfarin dose variation is a multifactorial feature, there are many other factors that might have a very small effect, thus, their detection become much more difficult, mainly when analyzed independently. In our study we did not investigated vitamin K intake

due to methodological difficulties, but Franco et al. (2004) show that an increase in dietary vitamin K intake decreases the INR and a decrease in dietary vitamin K intake increases the INR. Thus, vitamin K intake is a factor that can improve the algorithms to predict the best warfarin dose to each patient. Additionally, other drugs may interact with warfarin, but its inclusion in the regression model often becomes difficult due to the small number of patients using these medicines, an increase in sample size would be needed for this detection. Genes like  $\gamma$ -glutamyl carboxilase (GGCX) (Chen *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2007), PROC, apolipoprotein E (APOE) (Visser *et al.*, 2005), factor VII (F7) (Shikata *et al.*, 2004; D'Ambrosio *et al.*, 2004), calumenin (CALU) (Wajih *et al.*, 2004; Vecsler *et al.*, 2006; Gonzales-Conejero *et al.*, 2007) and microsomal epoxide hidrolase (EPHX1) (Loebstein *et al.*, 2005) have already been associated with warfarin dose in some studies and can also potentially improve prediction of dose models.

The validation of other published algorithms confirms that the equations need to be population specific. All of them presented lower  $R^2$  when were applied to our population when compared to the value obtained in the original population, with exception of the IWPC's model, which was based in a sample (n=4,043) originating from nine different countries (IWPC, 2009). This model presented an initial  $R^2=0.47$  and when it was validated in our sample the  $R^2$  value was 0.46. Utilization of this significant sample from four different continents is more representative of different populations. Development of an algorithm with a great  $R^2$  in a large sample may be an option for the elaboration of several specific models for each population. In a heterogeneous country like Brazil the relevant decrease in  $R^2$  observed when data from another Brazilian

sample (Perini et al. 2008) was used with the patients investigated herein is not unexpected. The population investigated in that study included individuals of mixed ancestry, whereas in the present study only Brazilians of European ancestry were investigated. The importance of ethnicity can be further observed by the difference observed between the original  $R^2$  ( $R^2=0.63$ ) and  $R^2$  obtained by validation in our population ( $R^2=0.36$ ) with a Chinese sample (Miao et al., 2007) which is easily explained by the different genetic and non-genetic features of Chinese population as compared to a South American population. Although a good prediction model was obtained in the present study, with a low AD and one of the highest determination coefficients described in the literature, it still needs to be tested in an independent sample to be validated for possible clinical use.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank nurse Graziella Aliti and nutritionist Gabriela Souza for help in sample and subject data collection. This work was supported by Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

## **REFERENCES**

Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Sirianni E, Novelli L, Bramanti P, Novelli G (2009) CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics* 10(2):261-266.



Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, Hubbard J, Turpaz Y, Langaee TY, Eby C, *et al.* (2008) CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111(8):4106-4112.

Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, Bentley D, Deloukas P, Wadelius M. (2005) Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing. *Blood* 106:3673–3674.

Cho HJ, Sohn KH, Park HM, Lee KH, Choi B, Kim S, Kim JS, On YK, Chun MR, Kim HJ, *et al.* (2007) Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients. *Pharmacogenomics* 8(4):329-337.

D'Ambrosio RL, D'Andrea G, Cappucci F, Chetta M, Di Perna P, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M (2004) Polymorphisms in factor II and factor VII genes modulate oral anticoagulation with warfarin. *Haematologica* 89:1510–1516.

D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M (2005) A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105(2):645-649.

Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. (2004) Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med* 116(10):651-656.

Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL (2004) Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 91(1):87-94.

Gage BF, Lesko LJ (2008a) Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis* 25(1):45-51.

Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, Milligan PE, Grice G, Lenzini P, Rettie AE, *et al.* (2008b) Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 84(3):326-331.

Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, Ferrer F, Sanchez-Serrano I, Sanchez-Blanco JJ, Marin F, Vicente V (2007) The genetic interaction between VKORC1 C1173T and calumenin A29809G modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost* 5:1701–1706.

Herman D, Peternel P, Stegnar M, Breskvar K, Dolzan V (2006) The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thromb Haemost* 95(5):782-787.

Hickmott H, Wynne HA, Kamali F (2003) The effect of simvastatin comedication on warfarin anticoagulation response and dose requirements. *Thromb Haemost* 89:949–950.

Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin D (2001) Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 119(1):8S-21S.

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (2009) Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 360(8):753-764.

Kamali F, Khan TI, King BP, Frearson R, Kesteven P, Wood P, Daly AK, Wynne H (2004) Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 75(3):204-212.

Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, *et al.* (2007) Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 120(2):181-186.

Lima MV, Ribeiro GS, Mesquita ET, Victor PR, Vianna-Jorge R (2008) CYP2C9 genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *Eur J Clin Pharmacol* 64(1):9-15.

Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, Roitelman J, Harats D, Halkin H, Ezra D (2001) Interindividual variability in sensitivity to warfarin-Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 70:159-164.

Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, Austerweil N, Gak E, Halkin H, Almog S (2005) Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther* 77:365–372.

Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799-810.

Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G (2000) Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 84:775-778.

Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z (2007) Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 63(12):1135-1141.

Pautas E, Moreau C, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahé I, Legendre C, Taillandier-Hériché E, Durand-Gasselín B, Houllier AM, Verrier P, Beaune P, Lorient MA, Siguret V (2010) Genetic factors (VKORC1, CYP2C9, EPHX1, and CYP4F2) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clin Pharmacol Ther* 87(1):57-64.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, Dias-Neto E, Suarez-Kurtz G. (2008) Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther* 84(6):722-728.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Suarez-Kurtz G (2010) Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. *Clin Pharmacol Ther* 87(4):417-20.

Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King, BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F (2005) The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7):2329-2333.

Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, Ohgi S, Otsubo K (2004) Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 103:2630–2635.

Taube J, Halsall D, Baglin, T (2000) Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 96(5):1816-1819.

Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, *et al.* (2009) A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet* 5(3):e1000433.

Vecsler M, Loebstein R, Almong S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, Gak E (2006) Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 95:205–211.

Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman CM, van Duijn CM, Stricker BH (2005) Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics* 15:69–74.

Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P (2009) The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 113(4):784-792.

Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2004) The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gammacarboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279:25276–25283.

Westergren T, Johansson P, Molden E (2007) Probable warfarin-simvastatin interaction. *Ann Pharmacother* 41(7):1292-1295.

Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 54(10):1257-1270.

Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, *et al.* (2005) A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 14(13):1745-1751.

Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R Jr, Linder MW (2007) Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin Chem* 53(7):1199-1205.

Table 1. Clinical characteristics of subjects.

<b>Indication for oral anticoagulation*</b>	<b>N (%)</b>
Atrial fibrillation	147 (52.7)
Heart valve prosthesis	122 (43.7)
Thromboembolism	56 (20.1)
Cerebrovascular disease	49 (17.6)
Thrombophilias	17 (6.1)
Others	6 (2.2)
<b>Other Medications*</b>	
AAS	103 (36.9)
Amiodarone	22 (7.9)
Anlodipine	36 (12.9)
Captopril	101 (36.2)
Carbamazepine	7 (2.5)
Digoxin	62 (22.2)
Enalapril	62 (22.2)
Spirolactone	24 (8.6)
Furosemide	99 (35.5)
Hydralazine	25 (9.0)
Hydrochlorothiazide	86 (30.8)
Isosorbide	25 (9.0)
Levothyroxine	23 (8.2)
Losartan	21 (7.5)
Metformin	34 (12.2)
Metoprolol	108 (38.7)
Omeprazole	59 (21.1)
Propranolol	41 (14.7)

Simvastatin	105 (37.6)
<b>Comorbidities*</b>	
Cardiopathy	77 (27.6)
Diabetes	59 (21.1)
Hypertension	168 (60.2)
Hypothyroidism	22 (7.9)
Renal failure	27 (9.7)

\*The subjects can have more than one concomitant indication for anticoagulation, medication or comorbidity.

Table 2. Medications of prolonged use and their influence on warfarin dose.

Medication	Dose with (n)	Dose without (n)	P
Anlodipine	26.74mg (36)	34.53mg (243)	0.001
Amiodarone	24.77mg (22)	34.27mg (257)	<0.001
β-blockers	31.90mg (166)	35.91mg (113)	0.028
Carbamazepine	47.14mg (7)	33.17mg (272)	0.019
Loop Diuretics	31.49mg (180)	37.22mg (99)	0.001
Statins	31.07mg (117)	35.29mg (162)	0.019

Table 3. Genotypic frequencies of SNPs and their respective average weekly dose (n=279).

Polymorphism (MAF,%)	CYP2C9*2 (13.4) e CYP2C9*3 (5.4)						VKORC1 -1639G>A (36.7)		
<b>Genotype</b>	CYP2C9*1/*1	CYP2C9*1/*2	CYP2C9*1/*3	CYP2C9*2/*2	CYP2C9*2/*3	CYP2C9*3/*3	-1639GG	-1639GA	-1639AA
<b>Frequencies (%)</b>	182 (65.2)	64 (22.9)	25 (9.0)	3 (1.1)	5 (1.8)	0 (0)	112 (40.2)	129 (46.2)	38 (13.6)
<b>Weekly dose (mg)</b>	36.72	28.98	27.30	15.00	17.50	-	41.38	29.57	23.75
<b>P (ANOVA)</b>	<0.001						<0.001		
Polymorphism (MAF,%)	VKORC1 1173C>T (36.9)			VKORC1 3730G>A (39.8)			CYP4F2 1347C>T (32.4)		
<b>Genotype</b>	1173CC	1173CT	1173TT	3730GG	3730GA	3730AA	CC	CT	TT
<b>Frequencies (%)</b>	112 (40.1)	128 (45.9)	39 (14.0)	106 (38.0)	124 (44.4)	49 (17.6)	119 (42.7)	139 (49.8)	21 (7.5)
<b>Weekly dose (mg)</b>	41.36	29.86	23.01	29.10	33.63	42.81	31.53	34.93	35.48
<b>P (ANOVA)</b>	<0.001			<0.001			0.084		
Polymorphism (MAF,%)	Factor 2 494C>T (15.6)			VKORC1 Diplotypes [-1639/1173/3730]*					
<b>Genotype</b>	494CC	494CT	494TT	GCG/GCG	GCG/GCA	GCG/ATG	GCA/GCA	GCA/ATG	ATG/ATG
<b>Frequencies (%)</b>	198 (71.0)	75 (26.9)	6 (2.1)	20 (7.2)	40 (14.3)	46 (16.5)	47 (16.8)	79 (28.3)	37 (13.3)
<b>Weekly dose (mg)</b>	33.51	33.80	30.42	41.13	40.75	28.75	42.50	30.19	23.44
<b>P (ANOVA)</b>	0.807			<0.001					

MAF = minor allele frequency

\*Only the main diplotypes, which account for 96.4% of diplotypes.



Table 4. Multiple linear regression models with and without CYP4F2 and F2 genes and VKORC1 haplotype.

Variables	Model with CYP4F2 gene, F2 gene and VKORC1 haplotype			Model without CYP4F2 gene, F2 gene and VKORC1 haplotype		
	b	$\beta$	P	b	$\beta$	P
Constant	1.540		<0.001	1.608		<0.001
Age	-0.003	-0.244	<0.001	-0.003	-0.225	<0.001
Weight	0.004	0.268	<0.001	0.004	0.271	<0.001
Amiodarone	-0.077	-0.113	0.004	-0.067	-0.132	0.017
Carbamazepine	0.198	0.156	<0.001	0.201	0.159	<0.001
$\beta$ -blockers	-0.047	-0.122	0.002	-0.037	-0.096	0.025
Anlodipine	-0.065	-0.118	0.004	-0.072	-0.132	0.002
Loop Diuretics	-0.037	-0.093	0.024	-0.040	-0.102	0.021
1 CYP2C9 variant	-0.129	-0.319	<0.001	-0.123	-0.305	<0.001
2 CYP2C9 variant	-0.280	-0.239	<0.001	-0.290	-0.247	<0.001
2 copies of GCG VKORC1 haplotype	0.101	0.134	0.008	-0.133*	-0.354*	<0.001*
1 copy of GCA VKORC1 haplotype	0.049	0.130	0.018	-0.254 <sup>†</sup>	-0.456 <sup>†</sup>	<0.001 <sup>†</sup>
2 copies of GCA VKORC1 haplotype	0.087	0.175	0.004	-	-	-
1 copy of ATG VKORC1 haplotype	-0.105	-0.279	<0.001	-	-	-
2 copies of ATG VKORC1 haplotype	-0.187	-0.332	<0.001	-	-	-
CYP4F2 CT	0.041	0.109	0.006	-	-	-
CYP4F2 TT	0.102	0.136	0.001	-	-	-
F2 TT	-0.120	-0.094	0.013	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>		0.656			0.595	
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>		0.633			0.577	

---

\*Values corresponding to GA genotype of -1639G>A polymorphism of VKORC1 gene

†Values corresponding to AA genotype of -1639G>A polymorphism of VKORC1 gene

Table 5. Comparison between predicted dose of published algorithms and the observed dose of our patients.

Algorithm	$r_s$	$R_s^2$	Original $R^2$
Zhu 2007	0.69	0.48	0.61
Herman 2006	0.68	0.46	0.60
IWPC 2009	0.68	0.46	0.47
Wadelius 2009	0.68	0.46	0.59
Gage 2008	0.65	0.42	0.53
Perini 2008	0.64	0.41	0.50
Sconce 2005	0.60	0.36	0.54
Miao 2007	0.60	0.36	0.63

---

In the table are represented the Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ), the determination coefficient based on  $r_s$  ( $R_s^2$ ) and the original  $R^2$  obtained by the authors.

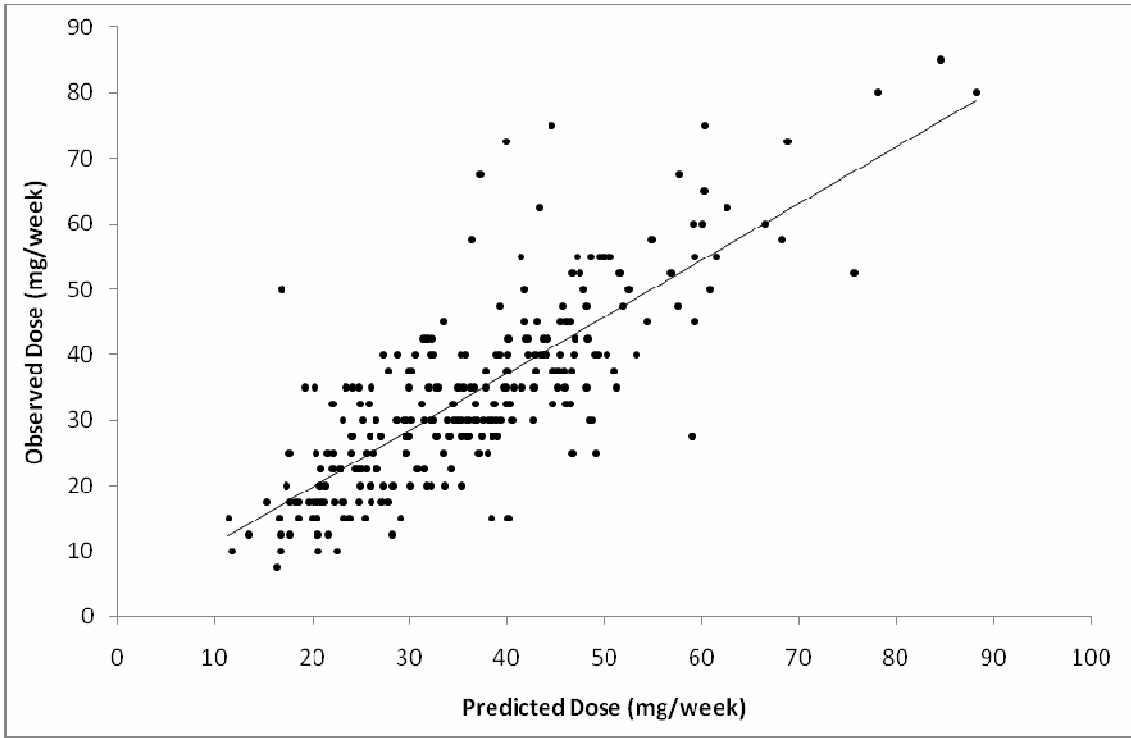


Figure 1. Relationship between the predicted dose by our algorithm and the observed dose of patients.

**CAPÍTULO 4**

**DISCUSSÃO**

Uma discussão mais específica dos resultados obtidos neste estudo encontra-se no artigo (capítulo 3). No presente capítulo, serão abordados aspectos mais gerais referentes a aspectos farmacogenéticos da varfarina e à utilização de algoritmos para a predição de dose deste anticoagulante.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com dados encontrados na literatura. Demonstramos que determinados polimorfismos nos genes *CYP2C9* (*CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3*), *VKORC1* (-1639G>A e 1173C>T) e *F2* (494C>T) são responsáveis por uma maior sensibilidade à varfarina, consistente com dados de outros trabalhos (Loebstein *et al.*, 2001; D'Ambrosio *et al.*, 2004; Shikata *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2007; Perini *et al.*, 2008). Dessa forma, pacientes portadores destas variantes necessitam de uma dose menor do anticoagulante. Em contrapartida, os SNPs 1347C>T no gene *CYP4F2* e 3730G>A no gene *VKORC1* determinam o uso de uma dose maior de varfarina (Kimura *et al.*, 2007; Caldwell *et al.*, 2008; Borgiani *et al.*, 2009). Polimorfismos nos genes *CYP4F2* e *F2* não foram importantes na variação de dose na análise univariada, já que são genes de pequeno efeito (Kurnik *et al.*, 2009). Entretanto, quando os polimorfismos destes genes foram analisados de forma controlada por co-variáveis, eles apresentaram um efeito significativo na variação da dose de varfarina. Perini *et al.* (2010) já demonstraram o mesmo efeito do gene *CYP4F2*, ao incorporá-lo no modelo de regressão juntamente com outras variáveis em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro. A base molecular para a influência deste gene na dose de varfarina foi elucidada recentemente por McDonald *et al.* (2009). Esta enzima participa da metabolização da vitamina K oxidada, que é substrato do *VKORC1*. O alelo 1347T é hipofuncional e, como consequência, ocorre o acúmulo

de vitamina K oxidada. Dessa forma, maiores doses de varfarina são necessárias. Em relação ao polimorfismo do gene *F2*, esse é o primeiro estudo na literatura que o inclui em um modelo de regressão para a elaboração de um algoritmo.

O algoritmo proposto no presente estudo conseguiu explicar 63,3% da variação de dose da varfarina. Este é um dos modelos com maior coeficiente de determinação dentre aqueles já descritos na literatura até o momento (Sconce *et al.*, 2005; Herman *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Gage *et al.*, 2008b; Perini *et al.*, 2008; IWPC, 2009). No nosso modelo, as variantes no gene *CYP2C9* são responsáveis por 15% da variação de dose e variantes no gene *VKORC1* contabilizam 23% desta variação. Estes são os principais fatores genéticos a influenciarem a dose deste anticoagulante oral e dificilmente outros fatores com maior influência serão encontrados. Levando em consideração que a variação de dose de varfarina é uma característica multifatorial, o restante da variação ainda não explicada provavelmente deve-se a muitos outros fatores com um efeito muito pequeno; assim, sua detecção torna-se mais difícil, principalmente quando analisados de forma independente.

Alguns algoritmos descritos na literatura foram testados em nossa população; porém, nenhum deles alcançou coeficiente de determinação de 0,50. Estes algoritmos foram baseados em populações dos seguintes países: Brasil (Perini *et al.*, 2008), Canadá (Zhu *et al.*, 2007), Eslovênia (Herman *et al.*, 2006), Estados Unidos (Gage *et al.*, 2008), Suécia (Wadelius *et al.*, 2009), Reino Unido (Sconce *et al.*, 2005) e China (Miao *et al.*, 2007). Além destes, ainda foi analisado um modelo baseado em uma amostra de 9 países (IWPC, 2009). Devido à grande diferença das características genéticas entre a população chinesa e a brasileira, o

algoritmo de Miao *et al.* (2007) foi o que teve pior desempenho ao ser aplicado na nossa população. Ainda, ao contrário do que se esperava, o algoritmo derivado da população do Estado do Rio de Janeiro (Perini *et al.*, 2008) não foi o que teve melhor desempenho. Isto provavelmente se deve à grande diversidade étnica que encontramos em nosso país e diferentes graus de miscigenação. O Rio Grande do Sul é um dos estados com menores índices de miscigenação, enquanto que o Rio de Janeiro apresenta um índice elevado, fazendo com que as características genéticas das populações desses locais apresentem um padrão diferente (Zembrzuski *et al.*, 2006).

Vários outros genes podem estar atuando na diferença dose/efeito da varfarina, tais como: *F7*, *GGCX*, *APOE*, *ABCB1/MDR1*, *CALU*, *EPHX1*, *PROC*, dentre outros. Mais estudos com a inclusão destes diferentes genes são importantes para que se tente explicar esta parcela de aproximadamente 40% da variação de dose do medicamento que ainda não foi descrita. Outros fatores não-genéticos também podem vir a aprimorar os algoritmos, como por exemplo, a dieta, principalmente no que se refere ao aporte de vitamina K, outros medicamentos e chás. Entretanto, a análise destes fatores muitas vezes torna-se complicada por questões metodológicas ou de número amostral.

Como mencionado no capítulo 1, atualmente a adequação da dose de varfarina para cada paciente é realizada por tentativa e erro. Porém, devido à grande diferença existente na resposta ao anticoagulante para cada paciente, muitos indivíduos levam entre três a quatro meses para conseguirem atingir o INR alvo. Levando em consideração que tanto abaixo quanto acima do alvo terapêutico os pacientes podem desenvolver problemas graves (trombose venosa, AVC,

hemorragias), o desenvolvimento de algoritmos que consigam estabelecer com precisão a dose necessária para cada paciente é de grande importância para que a utilização desta medicação seja feita com a segurança e a eficácia adequadas. Desde 2005 diversos grupos começaram a desenvolver algoritmos visando este objetivo. Entretanto, devido à significativa variação interpopulacional existente, em 2007, após o FDA fazer a recomendação da genotipagem de polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*, Thompson (2007) ressaltou a importância do desenvolvimento de algoritmos população-específicos.

Dessa forma, as perspectivas do trabalho são aprimorar o algoritmo para que se obtenha uma maior eficácia clínica, objetivando a mínima diferença entre a dose predita e a dose na qual o paciente se mantém estável. Além disso, para que se possa fazer a validação do modelo na população do Rio Grande do Sul, pretende-se testar o algoritmo em uma amostra independente. Assim, poderá ser avaliado qual o custo-benefício da utilização desta ferramenta para um possível uso futuro, visando a diminuição de reações adversas e aumento do resultado esperado (dosagens supratherapêuticas ou subterapêuticas).



## **REFERÊNCIAS**

---

Agno W, Squizzato A, Dentali F, Crowther M (2005) Tailoring warfarin induction doses to reflect individual and disease-specific factors. *Am J Med* 118:143–144.

Beyth RJ, Quinn L, Landefeld CS (2000) A multicomponent intervention to prevent major bleeding complications in older patients receiving warfarin. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 133:687–695.

Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, *et al.* (2005) Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106(1):135-140.

Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Sirianni E, Novelli L, Bramanti P, Novelli G (2009) CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics* 10(2):261-266.

Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, Hubbard J, Turpaz Y, Langae TY, Eby C, *et al.* (2008) CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111(8):4106-4112.

Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, Bentley D, Deloukas P, Wadelius M. (2005) Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing. *Blood* 106:3673–3674.

Cho HJ, Sohn KH, Park HM, Lee KH, Choi B, Kim S, Kim JS, On YK, Chun MR, Kim HJ, *et al.* (2007) Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients. *Pharmacogenomics* 8(4):329-337.

Connolly S, Pogue J, Hart R, Pfeffer M, Hohnloser S, Chrolavicius S, Pfeffer M, Hohnloser S, Yusuf S (2006) Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet* 367:9526:1903-1912.

D'Ambrosio RL, D'Andrea G, Cappucci F, Chetta M, Di Perna P, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M (2004) Polymorphisms in factor II and factor VII genes modulate oral anticoagulation with warfarin. *Haematologica* 89:1510–1516.

D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M (2005) A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105(2):645-649.

Douketis JD, Foster GA, Crowther MA, Prins MH, Ginsberg JS (2000) Clinical risk factors and timing of recurrent venous thromboembolism during the initial 3 months of anticoagulant therapy. *Arch Intern Med* 160:3431–3436.

Fennerty A, Dolben J, Thomas P, Backhouse G, Bentley DP, Campbell IA, Routledge PA (1984) Flexible induction dose regimen for warfarin and prediction of maintenance dose. *Br Med J* 288:1268–1270.

Fihn SD, McDonell M, Martin D, Henikoff J, Vermes D, Kent D, White RH (1993) Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. *Ann Intern Med* 118:511–520.

Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL (2004) Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 91(1):87-94.

Gage BF (2006) Pharmacogenetics-based coumarin therapy. *Hematology: Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:467-473.

Gage BF, Lesko LJ (2008a) Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis* 25(1):45-51.

Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, Milligan PE, Grice G, Lenzini P, Rettie AE, *et al.* (2008b) Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 84(3):326-331.

Gedge J, Orme S, Hampton KK, Channer KS, Hendra TJ (2000) A comparison of a low-dose warfarin induction regimen with the modified Fennerty regimen in elderly inpatients. *Age Ageing* 29:31-34.

Glurich I, Burmester JK, Caldwell MD (2008) Understanding the pharmacogenetic approach to warfarin dosing. *Heart Fail Rev no prelo*

Goldstein JA, de Morais SM (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4(6):285-299.

Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, Ferrer F, Sanchez-Serrano I, Sanchez-Blanco JJ, Marin F, Vicente V (2007) The genetic interaction between VKORC1 C1173T and calumenin A29809G modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost* 5:1701–1706.

Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267:83-90.

Gurwitz J, Avorn J, Ross-Degnan D, Choodnovskiy I, Ansell J (1992) Aging and the anticoagulant response to warfarin therapy. *Ann Intern Med* 116:901-904.

Harrison L, Johnston M, Massicotte MP, Crowther M, Moffat K, Hirsh J (1997) Comparison of 5-mg and 10-mg loading doses in initiation of warfarin therapy. *Ann Intern Med* 126:133-136.

Hatch E, Wynne H, Avery P, Wadelius M, Kamali F (2008) Application of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm derived from British patients to predict dose in Swedish patients. *J Thromb Haemost* 6(6):1038-1040.

Heimark LD, Wienkers L, Kunze K, Gibaldi M, Eddy AC, Trager WF, O'Reilly RA, Goulart DA (1992) The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 51:398-407

Herman D, Peternel P, Stegnar M, Breskvar K, Dolzan V (2006) The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thromb Haemost* 95(5):782-787.

Hermida J, Zarza J, Alberca I, Montes R, López ML, Molina E, Rocha E (2002) Differential effects of 2C9\*3 and 2C9\*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocoumarol. *Blood* 99(11):4237-4239.

Hickmott H, Wynne HA, Kamali F (2003) The effect of simvastatin comedication on warfarin anticoagulation response and dose requirements. *Thromb Haemost* 89:949–950.

Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin D (2001) Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 119(1):8S-21S.

Hummers-Pradier E, Hess S, Adham IM, Papke T, Pieske, B, Kochen MM (2003) Determination of bleeding risk using genetic markers in patients taking phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol* 59(3):213-219.

Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S (2007) Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation* 115:2689–2696.

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (2009) Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 360(8):753-764.

Jones M, McEwan P, Morgan CL, Peters JR, Goodfellow J, Currie CJ. (2005) Evaluation of the pattern of treatment, level of anticoagulation control, and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvar atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart* 91(4):472-477.

Kamali F, Khan TI, King BP, Frearson R, Kesteven P, Wood P, Daly AK, Wynne H (2004) Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 75(3):204-212.

Kaminsky LS, de Morais SM, Faletto MB, Dunbar DA, Goldstein JA (1993) Correlation of human cytochrome P4502C substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe. *Mol Pharmacol* 43:234-239.

Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, *et al.* (2007) Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 120(2):181-186.

Kirchheiner J, Ufer M, Walter EC, Kammerer B, Kahlich R, Meisel C, Schwab M, Gleiter CH, Rane A, Roots I, *et al.* (2004) Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* 14(1):19-26.

Kosaki K, Yamagishi C, Sato R, Semejima H, Fujita H, Tamura K, Maeyama K, Yamagishi H, Sugaya A, Dodo H, *et al.* (2006) 1173C>T polymorphism in VKORC1 modulates the required warfarin dose. *Pediatr Cardiol* 27(6):685-688.

Kurnik D, Loebstein R, Halkin H, Gak E, Almog S (2009) 10 years of oral anticoagulant pharmacogenomics: what difference will it make? A critical appraisal. *Pharmacogenomics* 10(12):1955-1965.

Lal S, Jada SR, Xiang X, Lim WT, Lee EJ, Chowbay B (2006) Pharmacogenetics of target genes across the warfarin pharmacological pathway. *Clin Pharmacokinet* 45(12):1189-1200.

Landefeld SC, Beyth R (1993) Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction and prevention. *Am J Med* 95:315-328.

Lee SC, Ng SS, Oldenburg J, Chong PY, Rost S, Guo JY, Yap HL, Rankin SC, Khor HB, Yeo TC, *et al.* (2006) Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population. *Clin Pharmacol Ther* 79(3):197-205.

Lenzini PA, Grice GR, Milligan PE, Dowd MB, Subherwal S, Deych E, Eby CS, King CR, Porche-Sorbet RM, Murphy CV, *et al.* (2008) Laboratory and clinical outcomes of pharmacogenetic vs. clinical protocols for warfarin initiation in orthopedic patients. *J Thromb Haemost* 6(10):1655-1662.

Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427(6974):541-544.

Lima MV, Ribeiro GS, Mesquita ET, Victor PR, Vianna-Jorge R (2008) CYP2C9 genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *Eur J Clin Pharmacol* 64(1):9-15.

Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR, Goldstein JA, Rieder MJ, Flockhart DA, Arnett DK, Acton RT, Liu N (2008) VKORC1 polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. *Pharmacogenomics* 9(10):1445-1458.

Linder MW, Looney S, Adams JE 3<sup>rd</sup>, Johnson N, Antonino-Green D, Lacefield N, Bukaveckas BL, Valdes R Jr (2002) Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis* 14(3):227-232.

Linkins LA, Choi PT, Douketis JD (2003) Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 139:893-900.

Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, Roitelman J, Harats D, Halkin H, Ezra D (2001) Interindividual variability in sensitivity to warfarin-Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 70:159-164.

Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, Austerweil N, Gak E, Halkin H, Almog S (2005) Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther* 77:365–372.

Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, Agarwal A, Peter I, Doheny D, van der Zee S, Jaremko M, Yoo C, Desnick RJ, *et al.* (2010) Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. *J Thromb Haemost* (no prelo)

Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G (2000) Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 84:775-778.

Marsh S, King CR, Porche-Sorbet RM, Scott-Horton TJ, Eby CS (2006) Population variation in VKORC1 haplotype structure. *J Thromb Haemost* 4:473–474.

McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE (2009) CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol* 75(6):1337-1346.

Meehan RR, Gosden JR, Rout D, Hastie ND, Friedberg T, Adesnik M, Buckland R, van Heyningen V, Fletcher J, Spurr NK, *et al.* (1988) Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *Am J Hum Genet* 42(1)26-37.

Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z (2007) Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 63(12):1135-1141.

Moridani M, Fu L, Selby R, Yun F, Sukovic T, Wong B, Cole DE (2006) Frequency of CYP2C9 polymorphisms affecting warfarin metabolism in a large anticoagulant clinic cohort. *Clin Biochem* 39(6)606-612.



Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S, Takahashi A, Kikuchi Y, Saito S, Shimomura H, Wanibuchi Y, Suzuki T, Kamatani N (2006) Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. *J Hum Genet* 51(3):249-253.

Muszkat M, Blotnik S, Elami A, Krasilnikov I, Caraco Y (2007) Warfarin metabolism and anticoagulant effect: a prospective, observational study of the impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence of drug-disease and drug-drug interactions. *Clin Ther* 29(3):427-437.

Oates A, Jackson PR, Austin CA, Channer KS (1998) A new regimen for starting warfarin therapy in out-patients. *Br J Clin Pharmacol* 46:157-161.

O'Connell MB, Kowal PR, Allivato CJ, Repka TL (2000) Evaluation of warfarin initiation regimens in elderly inpatients. *Pharmacotherapy* 20:923-930.

Perez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, González-Conejero R (2009) Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood* 113(20):4977-4979.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, Dias-Neto E, Suarez-Kurtz G. (2008) Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther* 84(6):722-728.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Suarez-Kurtz G (2010) Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. *Clin Pharmacol Ther* 87(4):417-20.

Redman AR (2001) Implications of cytochrome P450 2C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing. *Pharmacotherapy* 21:235-242.

Reitsma PH, van der Heijden JF, Groot AP, Rosendaal FR, Büller HR (2005) A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk. *PLoS Med* 2(10):996-998.

Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE (2005) Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 352(22):2285-2293.

Roberts GW, Druskeit T, Jorgensen LE, Wing LM, Gallus AS, Miller C, Cosh D, Eaton VS (1999) Comparison of an age adjusted warfarin loading protocol with empirical dosing and Fennerty's protocol. *Aust N Z J Med* 29:731-736.

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, *et al.* (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427(6974):537-541.

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL (1987) Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 13(3):285-292.

Sanderson S, Emery J, Higgins J (2005) CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 7(2):97-104.

Schalekamp T, Oosterhof M, van Meegen E, van Der Meer FJ, Conemans J, Hermans M, Meijerman I, de Boer A (2004) Effects of cytochrome P450 2C9 polymorphisms on phenprocoumon anticoagulation status. *Clin Pharmacol Ther* 76(5):409-417.

Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King, BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F (2005) The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7):2329-2333.

Sconce EA, Khan TI, Daly AK, Wynne HA, Kamali F (2006) The impact of simvastatin on warfarin disposition and dose requirements. *J Thromb Haemost* 4(6):1422-1424.

Sconce EA, Avery PJ, Wynne HA, Kamali F (2008) Vitamin K epoxide reductase complex sub-unit 1 (VKORC1) polymorphism influences anticoagulation response subsequent to vitamin K intake: a pilot study. *J Thromb Haemost* 6(7):1226-1228.

Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. (2010) Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J Thromb Thrombolysis* (no prelo)

Shepherd AM, Hewick DS, Moreland TA, Stevenson IH (1977) Age as a determinant of sensitivity to warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 4:315-320.

Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, Ohgi S, Otsubo K (2004) Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 103:2630–2635.

Sipeky C, Meleg B (2008) Haplogroup analysis of vitamin-K epoxide reductase (VKORC1) gene: novel element in the optimization of anticoagulant therapy. *Orv Hetil* 149(39):1839-1844.

Slaughter RL, Edwards DJ (1995) Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacother* 29:619-624.

Sontag TJ, Parker RS (2002) Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem* 277(28):25290-25296.

Suttie J (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54:459–477.

Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padriani R, Ieiri I, *et al.* (2006) Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics* 16(2):101-110.

Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, *et al.* (2009) A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet* 5(3):e1000433.

Taube J, Halsall D, Baglin, T (2000) Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 96(5):1816-1819.

Thompson CA (2007) FDA encourages genetics-aided warfarin dosing. *Am J Health Syst Pharm* 64(19):1994-1996.

Ufer M, Kammerer B, Kahlich R, Kirchheiner J, Yasar U, Brockmüller J, Rane A (2004) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-hydroxylation in vitro and in vivo. *Xenobiotica* 34(9):847-859.

Ufer M (2005) Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet* 44(12):1227-1246.

Vecsler M, Loebstein R, Almong S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, Gak E (2006) Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 95:205–211.

Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman CM, van Duijn CM, Stricker BH (2005) Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics* 15:69–74.

Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PK, Wadelius C, Melhus H (2004) Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics J* 4:40–48.

Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, Wallerman O, Melhus H, Wadelius C, Bentley D, Deloukas P (2005) Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 5:262–270.

Wadelius M, Pirmohamed M (2007a) Pharmacogenetics of Warfarin: Current Status and Future Challenges. *Pharmacogenomics J* 7:99-111.

Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P (2007b) Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 121:23-34.

Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P (2009) The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 113(4):784-792.

Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2004) The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gammacarboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279:25276–25283.

Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadée W (2008) Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood* 112(4):1013-1021.

Westergren T, Johansson P, Molden E (2007) Probable warfarin-simvastatin interaction. *Ann Pharmacother* 41(7):1292-1295.

White RH, Beyth RJ, Zhou H, Romano PS (1999) Major bleeding after hospitalization for deep-venous thrombosis. *Am J Med* 107:414–424.

Wynne H, Cope L, Kelly P, Whittingham T, Edwards C, Kamali F (1995) The influence of age, liver size and enantiomer concentrations on warfarin requirements. *Br J Clin Pharmacol* 40:203-207.

Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 54(10):1257-1270.

Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, Doi O, Kimura M, Kawarasaki Y, Inoue K, *et al.* (2009) Effect of VKORC1 -1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients, *Thromb Res* 124(2):161-166.

Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, *et al.* (2005) A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 14(13):1745-1751.

Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2006) Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 70:822-828.

Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R Jr, Linder MW (2007) Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin Chem* 53(7):1199-1205.



## **ANEXO 1**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- Pacientes usuários de cumarínicos**

Projeto de pesquisa: **“Polimorfismos nos genes CYP2C9 e VKORC1 e a sensibilidade aos cumarínicos”**

Pesquisadores: Luís Carlos Amon, Luís Eduardo Rohde, Beatriz Seligman, Mariana Botton, Mara H. Hutz, Eliane Bandinelli.

Ambulatório de Cardiologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ambulatório de Medicina Interna – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Telefones para contato: 3308.6728 (depto. Genética).

Os Serviços de Cardiologia e de Medicina Interna deste hospital e o Departamento de Genética da UFRGS estão promovendo o projeto de pesquisa **“Polimorfismos nos genes CYP2C9 e VKORC1 e a sensibilidade aos cumarínicos”**. O objetivo deste projeto é investigar o papel dos fatores genéticos na dosagem de cumarínicos. Além dos fatores genéticos, outros fatores como idade, alimentação e outros medicamentos interferem na dose dos cumarínicos. A determinação de um papel genético na resposta de cada pessoa é importante para melhor orientação das condutas em relação ao tratamento. O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e pelo Comitê de Ética deste hospital.

A participação no estudo envolve o preenchimento de uma ficha clínica e a doação de 5ml de sangue, que será utilizado para a realização do tempo de protrombina e extração do DNA.

Toda a participação neste estudo é absolutamente sigilosa, bem como os resultados da avaliação clínica e dos exames genéticos. É permitida a desistência em qualquer etapa da avaliação, sem qualquer tipo de prejuízo ao participante. O estudo será financiado por verba de agências de fomento, sendo que nenhum custo incidirá sobre o paciente ou seus familiares.

O material genético excedente poderá ser armazenado ou não, conforme a decisão de cada paciente. O material que ficar armazenado poderá ser utilizado



em novos exames ou para uso em novas pesquisas. No caso de serem propostas novas pesquisas com este material, elas serão avaliadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa local e nacional.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PROJETO:

**“Polimorfismos nos genes CYP2C9 e VKORC1 e a sensibilidade aos cumarínicos”**

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que fui convidado a participar do projeto de pesquisa “Polimorfismos nos genes CYP2C9 e VKORC1 e a sensibilidade aos cumarínicos” acima citado. Fui informado de que minha decisão em participar não comprometerá meu tratamento neste hospital, sendo meus dados e resultados de meus testes absolutamente sigilosos. Além disso, fui informado de que a qualquer momento posso solicitar minha desistência do estudo, sem qualquer prejuízo para meu tratamento. Declaro que consinto em participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados.

Com relação ao armazenamento de material genético eu declaro que:

( ) SIM: autorizo manter meu material genético excedente (DNA) armazenado, sabendo que poderá ser usado, no futuro, para novas pesquisas, as quais serão aprovadas pelo Comitê de Ética.

( ) NÃO: não autorizo armazenar meu material genético após este exame.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

Ass: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_