



Universidade Federal do Rio de Janeiro

FARMACOGENÉTICA DO ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA E O
IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP2C9* E *VKORC1*

Jamila Alessandra Perini

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Instituto de Bioquímica Médica

Doutorado em Química Biológica

FARMACOGENÉTICA DO ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA E O
IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP2C9* E *VKORC1*

JAMILA ALESSANDRA PERINI
Tese de Doutorado

Orientador: Guilherme Suarez-Kurtz
Prof^o Titular de Farmacologia, ICB, UFRJ

Rio de Janeiro 2009

FARMACOGENÉTICA DO ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA E O
IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP2C9* E *VKORC1*

Jamila Alessandra Perini

Tese submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Aprovada por:

Guilherme Suarez-Kurtz (Orientador)
Prof^o Titular de Farmacologia, ICB, UFRJ

Robson de Queiroz Monteiro (Revisor e Membro Suplente Interno)
Prof^o Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Paulo Antônio de Souza Mourão (Membro Examinador Interno)
Prof^o Titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Rosário Dominguez Crespo Hirata (Membro Examinador Externo)
Prof^a Associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP

Etel Rodrigues Pereira Gimba (Membro Examinador Externo)
Prof^a Adjunta da Universidade Federal Fluminense, UFF

Paulo de Assis Melo (Membro Suplente Externo)
Prof^o Associado do Departamento de Farmacologia, ICB, UFRJ

Rio de Janeiro, julho de 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA

Perini, Jamila Alessandra
FARMACOGENÉTICA DO ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA E O
IMPACTO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CYP2C9* E *VKORC1*. / Jamila
Alessandra Perini – Rio de Janeiro, 2009.

xviii, 150 f.

Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro –
UFRJ. Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

Orientador: Guilherme Suarez-Kurtz

1. Farmacogenética 2. Warfarina 3. *CYP2C9* 4. *VKORC1* – Dissertações.
I. Guilherme Suarez-Kurtz (orientador). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Centro de Ciências da Saúde. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Tese realizada no INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ e no INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química Biológica, sob a orientação do Professor Guilherme Suarez-Kurtz.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes” (Isaac Newton). Dedico este trabalho aos “gigantes”: Esther, Luiz Silvio e Daniel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amor, companheiro de todos os momentos, difíceis ou alegres, pela paciência, afeto e conselhos, aos quais nunca se omitiu. Sua presença no Rio de Janeiro foi indispensável para minha permanência e para minhas conquistas. Viver sozinha nesta “selva” não seria nada fácil. Daniel, eu te amo!

Às duas pessoas que eu mais admiro e das quais me orgulho, meus queridos pais Esther e Luiz Sílvio, que não mediram esforços e sempre se preocuparam em garantir meu desenvolvimento pessoal, intelectual e profissional. Formar e encaminhar quatro filhos, não é para qualquer mortal. Imagina para dois professores! Vocês dois são meus ídolos.

À minha amada Avó Hilda (*in memoriam*), que ajudou a formar a pessoa que hoje sou. Tenho certeza de que independente de onde estiver estará me iluminando. Nunca esquecerei a sua admirável capacidade de sempre ver o lado bom da vida.

Aos meus queridos irmãos - Jonathan, Janine e Jéssica - por me aguentarem e me amarem do jeito que eu sou. Sei que não é fácil. Obrigada pelo carinho, incentivo e pelas visitas, que mesmo esporádicas, contribuíram de maneira valiosa para recarregar minha bateria! Amo vocês.

Às eternas amigas e companheiras de todos os momentos, Grupo “Aquelas” (Alexandra, Cintia, Cristine, Fabíola, Fernanda, Flávia, Julia, Kalinca e Maria Aline), pelo incentivo, carinho e pelo orgulho que demonstram ter de mim. Nossos encontros sempre me fortalecem. Vocês são especiais.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme, que confiou no meu potencial e me possibilitou a realização deste trabalho.

À minha eterna aluna Iris, que além de trabalhar exaustivamente para realização deste trabalho também me fez aprender a ser chefe. Quantas perguntas... Era preciso pesquisar e estudar para poder te responder... Você contribuiu enormemente para minha formação. Obrigada! Você não será só uma ex-aluna, será sempre uma amiga pela qual tenho grande admiração e orgulho.

Às grandes amigas de trabalho Ivone e Lílian, que me ajudaram muito burocraticamente e emocionalmente. Vocês foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Obrigada pelo ombro amigo.

Ao Dr. Edimilson e ao enfermeiro Flávio Rangel, que abriram as portas do ambulatório de coagulação do INCL, me auxiliaram a selecionar os pacientes e a responder perguntas surgidas durante o projeto. Além de facilitar na captação de dados e de pacientes, vocês contribuíram ricamente com uma visão clínica e prática para aplicação do projeto.

Ao Dr. Cláudio Struchiner pela inestimável ajuda estatística. Quantos e-mails trocados, quantas dúvidas Sua paciência era infinita em nos explicar e resolver os problemas. Muito obrigada!

À Dra. Elida Ojopi por me receber em seu laboratório, pelo apoio técnico-científico, pela paciência e orientação dispensada.

À Daniela que me ajudou a recrutar os pacientes. Obrigada pelo sacrifício.

À companheira Ariane, que esteve presente desde o início da minha carreira no INCa. Foram tantos momentos agradáveis juntas e tantas confidências trocadas, que mesmo estando longe, sinto você sempre presente.

À sempre amiga, Rita. Apesar do tempo interrompido devido às forças maiores, você me ensinou a trilhar um caminho. Para mim você é como uma irmã mais velha (maracujá). Desculpe as vezes em que te magoei.

À minha primeira orientadora, Rosane, que me incentivou e me apoiou a entrar no ramo da pesquisa, minha eterna gratidão.

Aos companheiros do laboratório de Farmacologia do INCa: Ana Beatriz, Cristiano, Cyntia, Diogo, Dulce, Éderson, Fabiana, Fábio, Luisa, Marcelo, Mateus, Natália, Renato, Ticiania, Vanessa e Vera. Depois de tantas desavenças, provocadas por forças maiores, felizmente conseguimos um agradável convívio e uma boa amizade.

Ao meu revisor Robson, que foi extremamente solista e atencioso em todos os momentos.

Ao Ministério da Saúde, à Fundação Ary Frauzino e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, para o meu processo de crescimento pessoal e profissional. Incluí, aqui, os meus grandes amigos do curso de inglês e, especialmente, de terapia: Alana, Márcio e Nélia. Compartilhar experiências, anseios, dúvidas e alegrias em inglês é extremamente confortante e enriquecedor. Obrigada pelo carinho e por me entenderem tão bem! E finalmente, um agradecimento especial, aos pacientes que participaram deste estudo, que entenderam a importância da pesquisa para o progresso e a qualidade do tratamento crônico com anticoagulantes orais.

RESUMO

A warfarina é o anticoagulante oral mais utilizado no mundo. O ajuste da dose é baseado no monitoramento do tempo de coagulação da protrombina, expresso pela Razão Normalizada Internacional (INR). O estabelecimento adequado da dose de warfarina é dificultado devido à estreita janela terapêutica dos anticoagulantes orais, e à ampla variabilidade inter e intra-individual dos pacientes. A administração de uma dose incorreta, especialmente durante o início do tratamento, aumenta o risco de o paciente apresentar hemorragias ou falha no tratamento anticoagulante. Polimorfismos em dois genes de interesse farmacológico (*CYP2C9* e *VKORC1*) tem sido associados com a resposta terapêutica da warfarina. Assim, existe um enorme interesse no desenvolvimento de estratégias farmacogenéticas para determinar a dose terapêutica de warfarina.

Um algoritmo envolvendo variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas (idade, peso, indicação do tratamento com warfarina, uso concomitante de amiodarona e sinvastatina) foi desenvolvido para estimar a dose estável de warfarina, em 390 pacientes recrutados no ambulatório de coagulação do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras (INCL). O algoritmo farmacogenético explica 51% da variação na dose requerida de warfarina. A adição da primeira medida de INR/dose ao algoritmo aumenta o poder preditivo de 51% para 60%. Em ambos os algoritmos desenvolvidos, o genótipo 3673G>A de *VKORC1* é o que mais contribui na determinação da dose estável de warfarina, com R^2 de 23,9% e 20,1%, respectivamente. Outra variável genética analisada no estudo foi os genótipos *CYP2C9* (incluindo os alelos *2, *3, *5 e *11), que contribuíram com 6,9% da variação na dose requerida de warfarina no primeiro algoritmo e 5,7% no algoritmo que inclui a variável INR. O alelo 3673G>A ocorre em forte desequilíbrio de ligação com outros alelos *VKORC1* (5808T>G, 6853G>C e 9041G>A), que também foram mostrados neste trabalho influenciando na dose estável de warfarina. Entretanto, a adição dos diplótipos de *VKORC1* no algoritmo não aumentou o poder da modelagem desenvolvida. O poder preditivo do algoritmo farmacogenético foi similar nos três grupos de brasileiros autodeclarados de acordo com a cor da pele. Apesar de existir diferença ($P = 0.006$) entre as médias de doses dos pacientes autodeclarados como brancos (29 ± 13 mg/week, $n = 196$) e pretos (35 ± 15 mg/week, $n = 76$),

a cor da pele ou etnia não contribuiu de forma significativa no modelo de regressão múltipla do algoritmo farmacogenético.

Além de ser o primeiro trabalho a relatar a distribuição de polimorfismos genéticos em brasileiros, nosso estudo reflete o cotidiano e a realidade da terapia anticoagulante com warfarina, em consultas de rotina do Sistema Único de Saúde do INCL. O algoritmo farmacogenético pode ser facilmente aplicado em hospitais públicos brasileiros, já que as variáveis clínicas e demográficas utilizadas no algoritmo são obtidas no prontuário do paciente. Além disso, as genotipagens de *CYP2C9* e *VKORC1* podem ser realizadas a tempo do início da terapia anticoagulante.

Foram incluídos 217 pacientes brasileiros no Consórcio Internacional de Farmacogenética da Warfarina (IWPC), que compreende nove países de quatro continentes. Neste trabalho, dados clínicos e genéticos de 5052 pacientes foram usados para desenvolver um algoritmo baseado apenas em variáveis clínicas (idade, peso, altura, etnia, e medicamentos associados - carbamazepina, fenitoína, rifampicina ou amiodarona) e outro algoritmo que inclui também variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*). O algoritmo farmacogenético, que inclui fatores clínicos e genéticos, é o que melhor estima a dose estável de warfarina ($R^2 = 47\%$), quando comparado com o algoritmo clínico ($R^2 = 27\%$) ou pelo método de dose fixa. Entretanto, o algoritmo desenvolvido pelo IWPC utiliza a variável “raça/etnia”. Devido à complexa diversidade e a extensa miscigenação da população brasileira, a extrapolação de um algoritmo desenvolvido para populações homogêneas, e que inclui a variável “raça/etnia” não pode ser aplicado às populações com alto grau de miscigenação, como é o caso do Brasil.

ABSTRACT

Warfarin is the most commonly used oral anticoagulant in the world. The maintenance dose is usually determined by monitoring prothrombin time using an international normalized ratio (INR). The appropriate dose of warfarin is difficult to establish because of its narrow therapeutic index and large inter- and intra-individual variability. Incorrect dosage, especially during the initial phase of treatment, carries a high risk of bleeding or failure to prevent thromboembolism. Polymorphisms in two genes (*CYP2C9* and *VKORC1*) have been repeatedly found to associate with the clinical response to warfarin. Thus, there is interest in developing improved pharmacogenetics strategies for determining the appropriate dose.

A dosing algorithm including genetic (*VKORC1* and *CYP2C9* genotypes) and nongenetic factors (age, weight, therapeutic indication, and cotreatment with amiodarone or simvastatin) was developed in 390 patients attending an anticoagulant clinic in a Brazilian public hospital and explained 51% of the variance in stable weekly warfarin doses. The inclusion of the first available INR/dose measurement increased from 51% to 60% the predictive power of two warfarin-dosing pharmacogenetic algorithm for Brazilian patients. In both algorithms, the *VKORC1* 3673G>A genotype was the most important predictor of warfarin dose, with a partial R^2 value of 23.9% and 20.1%, respectively. The *CYP2C9* genotype (based on *2, *3, *5 and *11 alleles), the other genetic variable examined in this study, had a partial R^2 value of 6.9% in the first algorithm and 5.7% in the algorithm with variable INR. Replacing the *VKORC1* 3673G>A genotype with *VKORC1* diplotype did not increase the algorithm's predictive power. We suggest that the three other single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (5808T>G, 6853G>C, and 9041G>A) that are in strong linkage disequilibrium (LD) with 3673G>A would be equally good predictors of the warfarin dose requirement. The algorithm's predictive power was similar across the self-identified "race/color" subsets. "Race/color" was not associated with stable warfarin dose in the multiple regression model, although the required warfarin dose was significantly lower ($P = 0.006$) in white (29 ± 13 mg/week, $n = 196$) than in black patients (35 ± 15 mg/week, $n = 76$).

In addition to providing the first report of the distribution of *VKORC1* polymorphisms in the heterogeneous Brazilian population, our study reflects real-life community prescribing and dispensing of warfarin in the context of a public hospital in a developing country. The nongenetic covariates of our dosing algorithm are readily available in the patient medical record, whereas the

genetic covariates, namely, the *CYP2C9* and *VKORC1* 3673G>A genotypes, can be determined in a time frame compatible with the urgency of starting warfarin administration to many patients.

Two hundred and seventeen Brazilian patients were included in the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (IWPC) that comprises 21 research groups from 9 countries and 4 continents. Clinical and genetic data from 5052 patients were used to create a dose algorithm that was based on clinical variables only (age, weight, height, ethnicity, and cotreatment with carbamazepine, phenytoin, rifampicin or amiodarone) and an algorithm in which genetic information (*VKORC1* and *CYP2C9* genotypes) was added to the clinical variables. The use of a pharmacogenetic algorithm ($R^2 = 47\%$) for estimating the appropriate initial dose of warfarin produces recommendations that are significantly closer to the required stable therapeutic dose than those derived from a clinical algorithm ($R^2 = 27\%$) or a fixed-dose approach. However, the pharmacogenetic algorithm IWPC used variable race/ethnicity. Because of the heterogeneity and extensive admixture of the present-day Brazilian population, extrapolation of algorithms developed from well-defined ethnic groups, that use race/ethnicity categorization is clearly not applicable to the majority of Brazilians.

ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

X^2	Teste Qui-quadrado
3'-UTR	Região 3 linha não traduzida
A	Adenina
AD	Diferença absoluta entre a dose de warfarina real e a estimada
Ala	Alanina
APÖE	Apolipoproteína E
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
bias	erro sistemático ou tendenciosidade
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL _{int}	Depuração ou Clearance intrínseco
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Cys	Cisteína
D	Produto de PCR digerido com enzima de restrição
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanina
GGCX	Enzima gama-glutamil carboxilase
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ile	Isoleucina
INCa	Instituto Nacional de Câncer
INCL	Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras

INR	Razão Normalizada Internacional
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional
IWPC	Consórcio Internacional de Farmacogenética da Warfarina
Kb	Kilobases
Kg	Kilos
Leu	Leucina
mRNA	RNA mensageiro
ND	Produto de PCR não digerido com enzima de restrição
P	Padrão de peso molecular
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro	Prolina
r^2	Coefficiente de correlação
R^2	Coefficiente de correlação expresso em percentagem
RLFP	Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo com troca de um nucleotídeo
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Tirosina
Thr	Treonina
TP	Tempo de coagulação da protrombina
Trp	Triptofano
U	Unidade de enzima
UV	luz ultravioleta
VKOR	Enzima vitamina K epóxido redutase

ÍNDICE DE FIGURAS

página

Figura 1: Estrutura da 4-hidroxicumarina e seu derivado, warfarina	6
Figura 2: Mecanismo de ação da warfarina	7
Figura 3: Farmacocinética e farmacodinâmica da warfarina	8
Figura 4: Metabolismo do isômero S-warfarina pela enzima CYP2C9	9
Figura 5: Equação para o cálculo do INR	11
Figura 6: Localização do gene <i>CYP2C9</i> no cromossomo 10q24	13
Figura 7: Polimorfismos não silenciosos mapeados na estrutura cristal da enzima CYP2C9	15
Figura 8: Gráfico de Michaelis-Menten para S-warfarina em leveduras	21
Figura 9: Medida de INR em função da dose requerida de warfarina	23
Figura 10: Topologia da enzima vitamina K epóxido redutase	25
Figura 11: Correlação haplotípicos e a expressão do mRNA de <i>VKORC1</i>	28
Figura 12: Gel de agarose para caracterização do alelo <i>CYP2C9*2</i>	39
Figura 13: Sequenciamento da região do exon 7 de <i>CYP2C9</i>	40
Figura 14: Determinação dos genótipos <i>VKORC1</i> 6853G>C por PCR em tempo real	43

ÍNDICE DE TABELAS

página

Tabela 1: Biomarcadores farmacogenéticos	2
Tabela 2: Medicamentos que receberam informações genéticas em suas bulas pelo FDA	4
Tabela 3: Distribuição populacional de polimorfismos genéticos de <i>CYP2C9</i>	17
Tabela 4: Haplótipos <i>CYP2C9</i>	19
Tabela 5: Comparação da frequência alélica de <i>VKORC1</i> em diferentes populações	27
Tabela 6: Contribuição de variáveis na dose de warfarina em diferentes populações	30
Tabela 7: Dados demográficos e clínicos dos 390 pacientes participantes do estudo	35
Tabela 8: Lista dos oligos utilizados nas reações de PCR	37
Tabela 9: Concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR para cada ensaio	37
Tabela 10: Oligos e sondas utilizados no ensaio de fluorescência com TaqMan	42

ÍNDICE GERAL

página

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. FARMACOGENÉTICA	1
1.2. ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA	5
1.2.1. Uso clínico e monitoração da warfarina	9
1.3. ENZIMA CYP2C9	12
1.4. ENZIMA VITAMINA K EPÓXIDO REDUTASE	23
1.5. ALGORITMOS QUE ESTIMAM A DOSE REQUERIDA DE WARFARIN	29
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. AMOSTRAGEM POPULACIONAL ESTUDADA	33
3.2. COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA	36
3.3. ANÁLISE DOS ALELOS <i>CYP2C9</i> *2,*3,*5 E *11	36
3.4. ANÁLISE DOS ALELOS <i>VKORC1</i> 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C E 9041G>A	41
3.5. MODELO DE REGRESSÃO MÚLTIPLA	43
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA EM PACIENTES BRASILEIROS	46
4.2. CONTRIBUIÇÃO DO INR NA DOSE REQUERIDA DE WARFARINA	62
4.3. CONSÓRCIO INTERNACIONAL DE FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA	67

5. CONCLUSÕES	102
5.1. FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA EM PACIENTES BRASILEIROS	102
5.2. CONTRIBUIÇÃO DO INR NA DOSE REQUERIDA DE WARFARINA	103
5.3. CONSÓRCIO INTERNACIONAL DE FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
7. ANEXOS	
7.1. ANEXO I	124
Projeto submetido à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP e ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras - INCL	
7.2. ANEXO II	137
Aprovação do projeto pela CONEP	
7.3. ANEXO III	139
Aprovação do projeto pelo CEP do INCL	
7.4. ANEXO IV	141
Termo de consentimento livre e esclarecido	
7.5. ANEXO V	144
Questionário aplicado no estudo	
CURRICULUM VITAE	149

1. INTRODUÇÃO

1.3. FARMACOGENÉTICA

A farmacogenética estuda a variação da resposta aos fármacos devido a fatores genéticos ou hereditários (Kalow, 1962) e pode ser considerada como um caso especial de interação gene-ambiente, no qual a exposição ambiental (um fármaco) pode ser bem avaliada e direcionada a um indivíduo específico (Hunter, 2005).

A primeira referência à variabilidade da resposta farmacológica é atribuída ao geômetra grego Pitágoras que, em 510 a.C, descreveu a intoxicação provocada por determinadas favas em alguns, mas não em todos os indivíduos que as ingeriam. Mas, a farmacogenética tem suas origens na década de 1950, com a demonstração de associações entre o caráter hereditário e efeitos dos medicamentos (Motulsky, 1957). Nesses últimos 50 anos, a farmacogenética evoluiu muito e foi recentemente rebatizada como farmacogenômica com emergência do “Projeto Genoma Humano”. Não existem limites definidos entre farmacogenética e farmacogenômica, e freqüentemente os dois termos são usados como sinônimos (www.refargen.org.br).

A maior promessa da farmacogenética é contribuir para a individualização da terapêutica, com base no conhecimento dos fatores genéticos que modulam a farmacocinética (taxa em que o organismo absorve, transporta, metaboliza, ou excreta os medicamentos e seus metabólitos) e a farmacodinâmica (efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos e seus mecanismos de ação) dos medicamentos. Portanto, de forma geral, a farmacogenética trata de qualquer variação genética que afete a resposta aos medicamentos, em termos tanto de eficácia quanto de toxicidade (Thompson & Thompson, 2003).

Existe um grande crescimento no número de estudos na literatura que correlacionam genótipo e dose requerida de diferentes medicamentos (Goldstein e cols., 2003; Roses, 2004; Brockmöller e cols., 2008). O desenvolvimento de um perfil genético com um valor preditivo de toxicidade ou de uma reação adversa promove um benefício imediato ao permitir a escolha ou a dose do medicamento para o qual o paciente não está sob risco de apresentar um evento adverso, ou decidir sobre a dosagem que assegura a terapia adequada e minimiza as complicações. Entretanto, é preciso comprovar a relação custo-benefício da aplicação da farmacogenética à assistência médica existente. A eficácia e a segurança de medicamentos que são prescritos com base no genótipo do paciente são limitados a alguns exemplos (tabela 1) em que a relação custo-benefício é positiva.

Tabela 1: Biomarcadores farmacogenéticos (Ingelman-Sundberg, 2008).

Gene ou Alelo	Medicamento	Especificidade do Biomarcador	% de pacientes com reação adversa ao medicamento
<i>TPMT</i>	6-Mercaptopurina	Muito bom	1-10
<i>UGT1A1*28</i>	Irinotecan	Bom	30-40
<i>CYP2C9 e VKORC1</i>	Warfarina	Bom	5-40
<i>CYP2D6</i>	Antidepressivos tricíclicos	Relativamente bom	5-7
<i>HLA-B*5701</i>	Abacavir	Muito bom	5-8
<i>HLA-B*1502</i>	Carbamazepina	Muito bom	10
<i>HLA-DRB1*07 e</i>			
<i>DQA1*02</i>	Ximelagatran	Bom	5-7

Conforme citado na tabela 1, o anticoagulante oral warfarina é um exemplo marcante da aplicação da farmacogenética na prática clínica. A warfarina está entre os dez medicamentos que provocam o maior número de eventos adversos graves (Lesko, 2008). As estimativas indicam que os pacientes que recebem tratamento com warfarina apresentam uma taxa anual de hemorragia fatal ou grave de 0,1 a 16% (Aithal e cols., 1999; Anderson e cols., 2007). A variabilidade intra-individual observada na resposta farmacológica da warfarina é atribuída a fatores demográficos e clínicos, entretanto, a influência de variáveis genéticas é inquestionável (Yin e cols., 2006; Wadelius e cols., 2007; Lesko, 2008; Kim e cols., 2009). Neste contexto, em agosto de 2007, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de testes genéticos na terapia com warfarina, visando a individualização da terapêutica baseada na farmacogenética (<http://www.fda.gov/bbs/topics/NWES/2007>). Assim como a de outros medicamentos (tabela 2), a bula do anticoagulante oral warfarina foi recentemente revisada pelo FDA e nela foram incluídas informações sobre o efeito potencial de alterações genéticas na dose requerida de warfarina, com intenção de reduzir eventos adversos, especialmente no início do tratamento (Gage e cols., 2008; <http://www.fda.gov/bbs/topics/NWES/2007/NEW01684.html>).

Tabela 2: Medicamentos que receberam informações genéticas em suas bulas pelo FDA (Kim e cols., 2009).

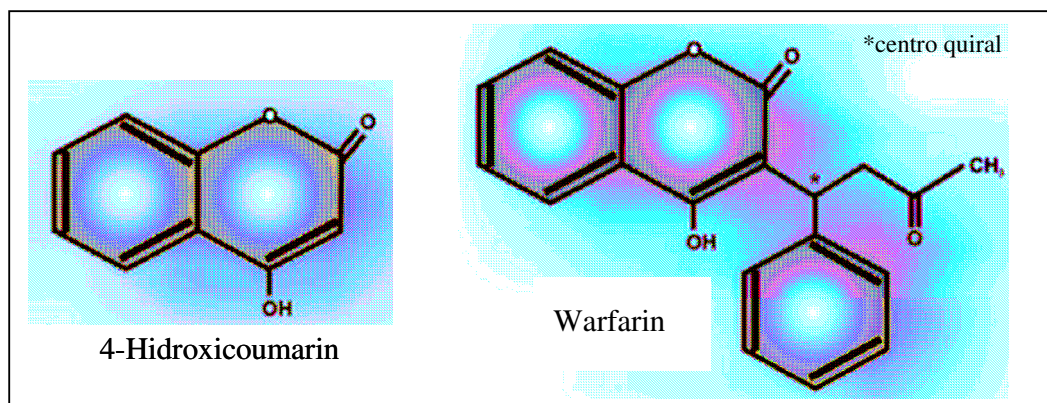
Área Terapêutica	Medicamento	Informação Genética
Antiviral	Maraviroc	Indicado para CCR5-positivo
	Abacavir	Atenção em pacientes que apresentam o alelo <i>HLA-B*5701</i>
Hematologia	Warfarina	Pacientes com polimorfismos <i>CYP2C9</i> ou <i>VKORC1</i> devem receber uma baixa dose inicial
Neuro-farmacologia	Carbamazepina	Atenção em pacientes que apresentam o alelo <i>HLA-B*1502</i>
	Xenazina	Doses >50mg não devem ser administradas sem prévia genotipagem dos alelos <i>CYP2D6</i>
Oncologia	Trastuzumab	Indicado para pacientes com superexpressão HER2
	Irinotecan	Redução da dose para pacientes <i>UGT1A1*28</i>
	6-Mercaptopurina	Ajuste de dose para pacientes que apresentam alelos variantes no gene <i>TPMT</i>
	Erlotinib	Diferença na sobrevida e na resposta tumoral em pacientes positivos e negativos para EGFR
Dor	Codeína	Metabolizadores ultra-rápidos convertem codeína em morfina rapidamente
Psicofarmacologia	Tioridazina	Contra-indicado para metabolizadores lentos (<i>CYP2D6</i>)
	Atomoxetina	Ajuste de dose para metabolizadores lentos (<i>CYP2D6</i>)
Transplante	Azatiopurina	Ajuste de dose para pacientes que apresentam alelos variantes no gene <i>TPMT</i>

1.4. ANTICOAGULANTE ORAL WARFARINA

Os anticoagulantes orais tornaram-se disponíveis como consequência indireta de uma mudança ocorrida na política agrícola da América do Norte, na década de 1920. O milho utilizado para a alimentação do gado foi substituído pelo trevo doce. Esta mudança ocasionou a epidemia de morte do gado causada por hemorragia. Mais tarde foi constatado que as hemorragias eram causadas devido à presença de bis-hidroxycumarina no trevo doce estragado. Em 1948, foi introduzido um congênere sintético mais potente, que passou a ser utilizado como rodenticida extremamente eficaz. O composto foi denominado warfarina, como acrônimo derivado do nome do detentor da patente, a Wiscosin Alumni Research Foundation, acrescido do sufixo arina derivado da cumarina. O potencial de uso da warfarina como agente terapêutico para a doença tromboembólica foi reconhecido, mas não amplamente aceito, em parte devido ao temor de toxicidade inaceitável. Entretanto, em 1951, um recruta do exército americano sobreviveu sem problemas a uma tentativa de suicídio com doses maciças de uma preparação de warfarina utilizada para controle de roedores (Goodman & Gilman, 2003). Desde 1954, a warfarina tornou-se a base para a prevenção e o tratamento da doença tromboembólica, sendo administrada, anualmente, a centenas de milhares de pacientes que apresentam trombose venosa, embolismo pulmonar, fibrilação atrial e válvulas cardíacas ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2[1].pdf)).

A warfarina é derivada da 4-hidroxycumarina (figura 1), constituindo uma mistura racêmica com isômeros R e S (D'Andrea e cols., 2008). Os enantiômeros diferem na sua potência anticoagulante, no metabolismo e nas interações com outros fármacos (O' Reilly e cols., 1987), sendo que o isômero S-warfarina apresenta um efeito anticoagulante cinco vezes mais potente do que o isômero R-warfarina (Takahashi e cols., 2001; Wittkowsky, 2003).

Figura 1: Estrutura da 4-hidroxicumarina e seu derivado, warfarina (Adaptado de D'Andrea e cols., 2008).

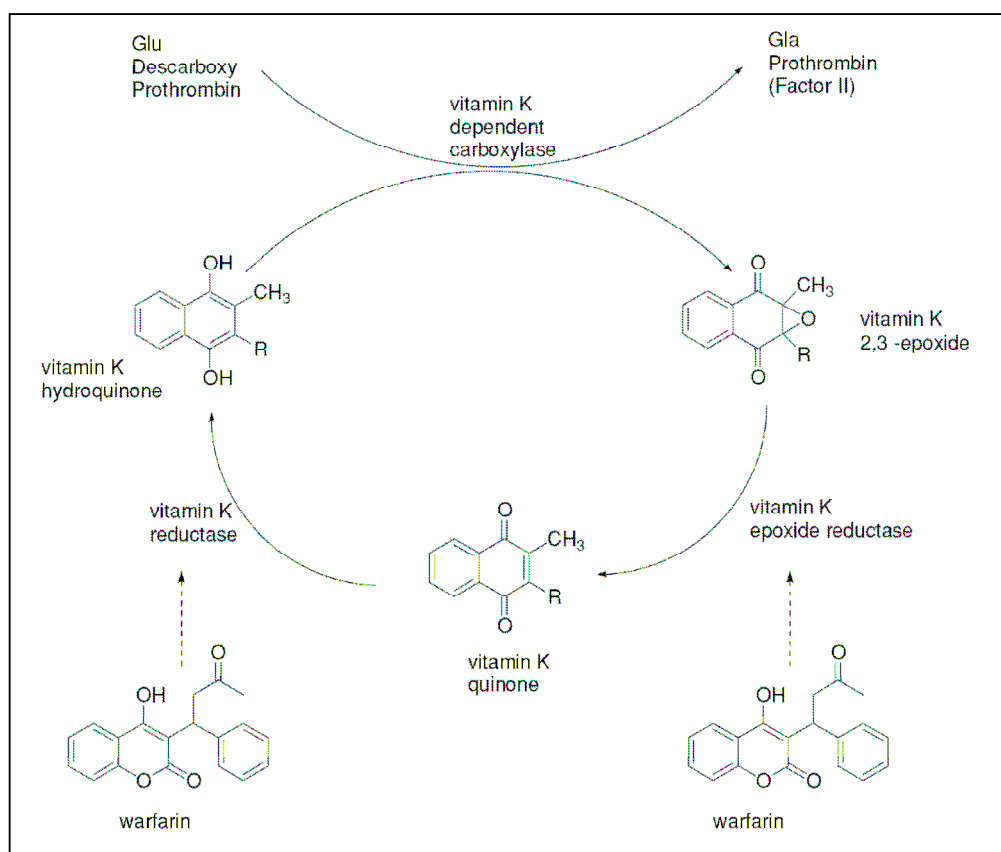


A figura 2 mostra o mecanismo de ação da warfarina. Seu efeito anticoagulante é obtido devido à inibição da enzima epóxido redutase, responsável por reduzir a vitamina K em quinona e, em seguida, em hidroquinona (Palkimans e cols., 2003; Tie e cols., 2008). Juntamente com dióxido de carbono e oxigênio molecular, a hidroquinona atua como um cofator na conversão do ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico, pela enzima gama-glutamil carboxilase (GGCX), responsável pela carboxilação dos fatores de coagulação II, VII, IX e X (Palkimans e cols., 2003; Gage, 2006; D'Andrea e cols., 2008). Os resíduos de γ -carboxiglutâmico conferem às proteínas de coagulação propriedades de ligação ao cálcio, que são essenciais para a sua organização em um complexo catalítico eficiente na superfície da membrana (Goodman & Gilman, 2003).

As doses terapêuticas de warfarina diminuem a quantidade total de cada um dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K, sintetizados pelo fígado em 30-50%. O tempo necessário para que a atividade de cada fator plasmático atinja um novo estado de equilíbrio dinâmico após o início da terapia ou o seu ajuste depende da taxa de depuração de cada fator. As meias-vidas aproximadas são as seguintes: fator VII - são seis horas; fator IX vinte e quatro horas; fator X trinta e seis horas; fator II cinquenta horas; proteína C oito horas e proteína S trinta horas. Devido

às meias-vidas longas de alguns dos fatores de coagulação, em particular do fator II, o efeito antitrombótico total após a instituição da terapia com warfarina só é atingido depois de vários dias, apesar do tempo de coagulação da protrombina se alterar logo após sua administração, em virtude da redução rápida dos fatores com meia-vida mais curta, em particular o fator VII (Hirsh e cols., 1998; Palkimans e cols., 2003).

Figura 2: Mecanismo de ação da warfarina (Palkimans e cols., 2003).



A warfarina é administrada por via oral e sofre absorção rápida e completa pelo trato gastrointestinal. Possui pequeno volume de distribuição e liga-se fortemente à albumina plasmática. A concentração máxima no sangue ocorre uma hora após a sua ingestão, mas em virtude de seu mecanismo de ação, esse pico não coincide com o efeito farmacológico máximo,

que ocorre cerca de 48 horas mais tarde. O efeito de uma dose única aparece depois de 12-16 horas e dura 4-5 dias (D'Andrea e cols., 2008).

O metabolismo da warfarina ocorre via sistema hepático P450 de oxidases de função mista (figura 3), e sua meia-vida é muito variável, em média sendo da ordem de 40 horas (Kaminsky e cols., 1997; D'Andrea e cols., 2008). O isômero responsável por cerca de 60 a 70% do efeito anticoagulante, S-warfarina (Takahashi e cols., 2001), é metabolizado em (S)-7-hidroxiwarfarina e (S)-6-hidroxiwarfarina exclusivamente pela enzima CYP2C9 (figura 4). Em contrapartida, o isômero R que possui uma menor taxa de depuração sistêmica (Palkimans e cols., 2003), é metabolizado em (R)-6-hidroxiwarfarina e (R)-8-hidroxiwarfarina pelas enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP3A4 (Kaminsky e cols., 1997).

Figura 3: Farmacocinética e farmacodinâmica da warfarina (Gage e cosl., 2008)

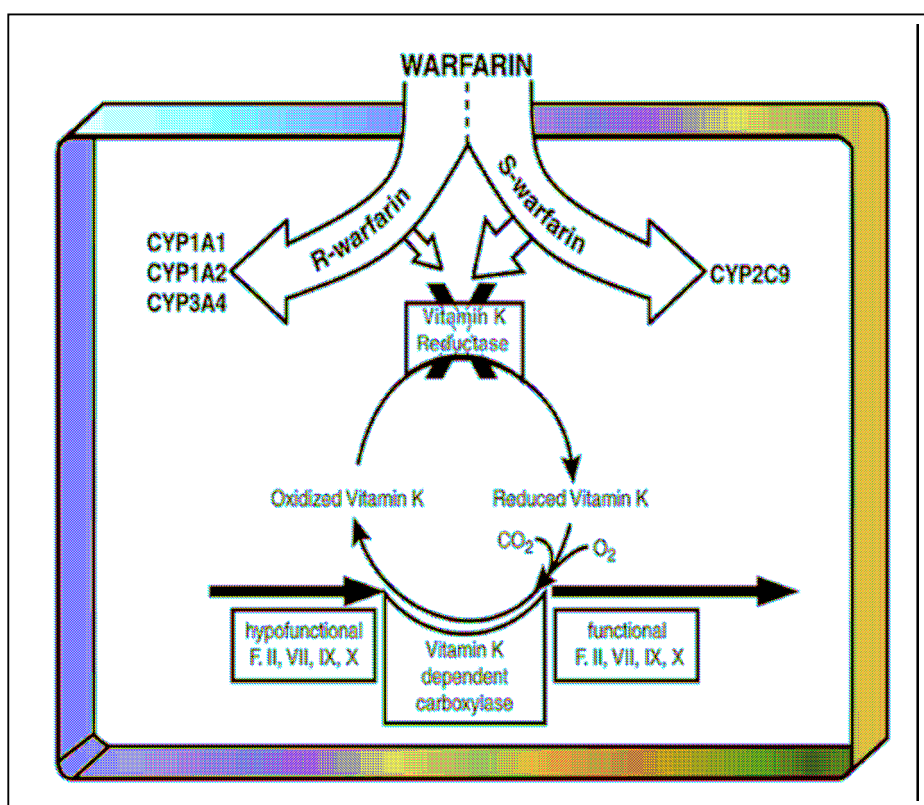
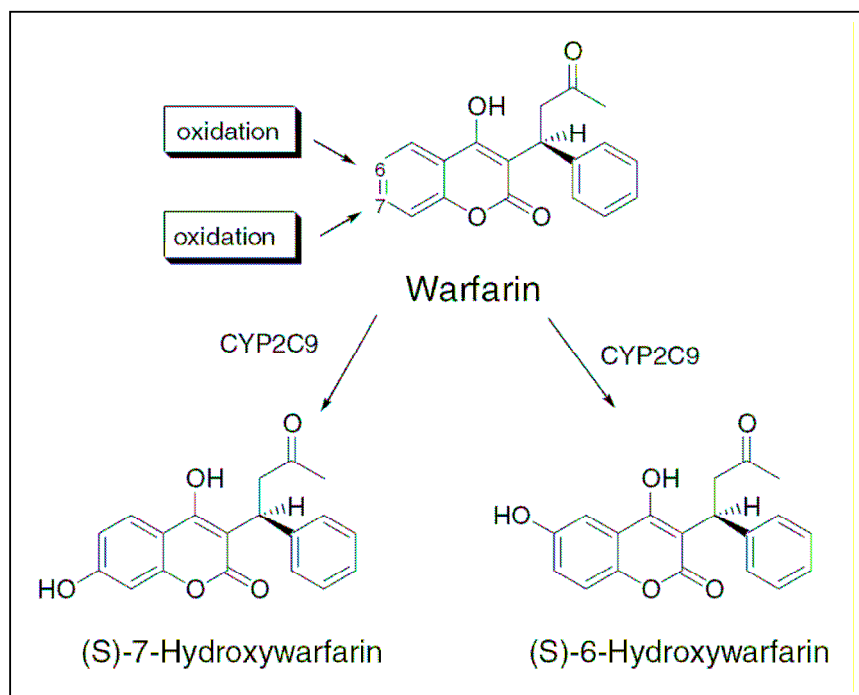


Figura 4: Metabolismo do isômero S-warfarina pela enzima CYP2C9, formando os metabólitos (S)-7-hidroxiwarfarina e (S)-6-hidroxiwarfarina (Palkimas e cols., 2003)



1.4.1. Uso clínico e monitoração da warfarina

Para inferir a dose de warfarina do paciente, antes do início da terapia anticoagulante são efetuados exames laboratoriais, cujos resultados são utilizados juntamente com dados clínicos e com a história do exame físico do paciente. Segundo o FDA, a terapia com warfarina deve ser iniciada com uma dose diária entre 2 a 5 miligramas, seguida de um ajuste baseado no ensaio de coagulação denominado tempo de protrombina (TP) ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2[1].pdf)). A medida de TP é expressa pela Razão Normalizada Internacional (INR) que é adotada como um parâmetro laboratorial para monitorar a eficácia e a adesão do paciente ao tratamento anticoagulante, bem como um guia no

ajuste de dose da warfarina (Jaffer e cols., 2003). Após atingir o INR terapêutico, as doses semanais de warfarina podem variar entre 4 e 80 miligramas (Gage e cols., 2008).

As faixas terapêuticas de INR para as várias indicações clínicas foram estabelecidas a fim de reduzir a morbidade por doença tromboembólica, bem como o risco de hemorragia. Para a maioria das indicações, o INR alvo é de 2 a 3, enquanto que para pacientes com próteses mecânicas de valvas cardíacas recomenda-se um INR alvo mais alto de 2,5 a 3,5 (Hirsh e cols., 2001, Blann e cols., 2002, Jaffer e cols., 2003). As medidas diárias do INR são indicadas no início da terapia para evitar a ocorrência de anticoagulação excessiva no paciente muito sensível, além de confirmar a adesão do paciente ao tratamento. O intervalo entre os testes pode ser gradualmente aumentado até um intervalo semanal e, em seguida, mensal para pacientes submetidos à terapia prolongada ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2[1].pdf)).

O exame laboratorial para avaliar o TP do paciente é realizado em uma amostra de sangue coletada em jejum, dentro de 8 a 14 horas após a última dose administrada do anticoagulante oral. O TP apresenta-se prolongado quando os níveis funcionais de fibrinogênio, fator V ou fatores II, VII ou X dependentes de vitamina K estão diminuídos (Goodman & Gilman, 2003).

Os esforços para padronizar os testes de TP entre os laboratórios, na década de 1990, levaram à adoção disseminada do sistema de INR. As medidas do TP são convertidas em medidas de INR por meio da equação mostrada na figura 5. O valor do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), fornecido pelo fabricante, indica a sensibilidade relativa do TP determinado por uma tromboplastina específica a reduções dos fatores da coagulação dependentes de vitamina K em comparação com um padrão de tromboplastina humana da Organização Mundial de Saúde (Ansell e cols., 2004).

Figura 5: Equação para o cálculo do INR (Goodman & Gilman, 2003).

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP}_{\text{paciente}}}{\text{TP}_{\text{referência}}} \right)^{\text{ISI}}$$

INR = Razão Normalizada Internacional
ISI = Índice de Sensibilidade Internacional

O sangramento constitui a principal toxicidade dos anticoagulantes orais (Schulman e cols., 2008). Os episódios especialmente graves envolvem locais onde a ocorrência de lesão irreversível pode resultar da compressão de estruturas vitais (intracraniana, pericárdica, da bainha dos nervos ou da medula espinhal) ou de perda interna maciça de sangue, que pode não ser diagnosticada rapidamente (gastrintestinal, intraperitoneal, retroperitoneal). O risco de hemorragia é mais pronunciado durante os primeiros meses do início do tratamento, quando a dose está sendo ajustada de acordo com o INR (Landefeld e cols., 1993; Hylek, 2003). Dependendo da urgência da situação, o tratamento pode consistir na interrupção da warfarina, administração de vitamina K ou plasma fresco, bem como da administração de concentrado de fatores da coagulação ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2[1].pdf)).

O uso terapêutico da warfarina exige um cuidadoso equilíbrio entre a administração de uma dose muito pequena, que não modifica a coagulação desregulada, e o uso de uma quantidade excessiva, causando hemorragia. A terapia é complicada em virtude da existência de numerosas condições que modificam a sensibilidade à warfarina, incluindo fatores clínicos, ambientais e genéticos. Dentre estes fatores encontram-se: idade, sexo, superfície corpórea, função hepática e

renal, severidade e tipo de doença, uso concomitante de medicações e polimorfismos genéticos, que afetam tanto o metabolismo da warfarina (enzima CYP2C9) quanto o seu alvo biológico (enzima epóxido redutase) (Wadelius e cols., 2007; Gage e cols., 2008; Kim e cols., 2009; [http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2[1].pdf)).

1.3. ENZIMA CYP2C9

A enzima CYP2C9 pertence ao citocromo P450, que compreende um grupo de hemoproteínas (Rendic e cols., 1997), cujos genes *CYPs* diversificaram-se a partir de sua origem há mais de 3,5 bilhões de anos, para adaptar-se ao metabolismo de diversas substâncias químicas ambientais, toxinas alimentares e medicamentos. O metabolismo de fármacos e outros xenobióticos em metabólitos mais hidrofílicos é fundamental para a eliminação desses compostos e, conseqüentemente, o término da sua atividade biológica. Essa conversão dos fármacos em metabólitos mais polares e inativos, geralmente é de natureza enzimática, e esses sistemas enzimáticos estão localizados, principalmente, no fígado, embora qualquer tecido examinado tenha alguma atividade metabólica (Goodman & Gilman, 2003).

Dentre as enzimas P450 conhecidas atualmente, cerca de 50 têm atividade funcional nos seres humanos, sendo categorizadas em 18 famílias e 44 subfamílias, segundo as semelhanças entre as seqüências de aminoácidos das proteínas previstas. A sigla CYP é utilizada para sua identificação, e as seqüências iguais em mais de 40%, pertencem à mesma família, identificadas por um número (por exemplo: CYP2). No interior de uma família, as seqüências iguais em mais de 55% estão na mesma subfamília, identificadas por uma letra (por exemplo: CYP2C), e as diferentes isoformas na subfamília são identificadas por um número (por exemplo: CYP2C9). As

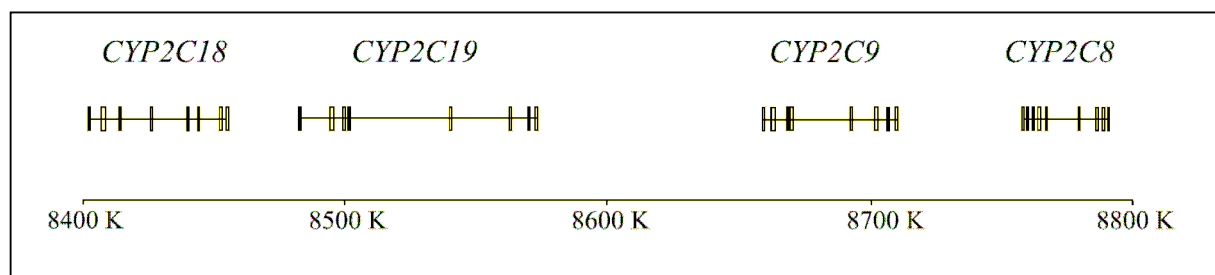
variantes alélicas de cada enzima são, então, designadas por um asterisco seguido de outro número (por exemplo: *CYP2C9*2*) (<http://drnelson.utmem.edu/human.P450.table.html>).

Dentre essas enzimas, as famílias CYP2 e CYP3 são as responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos e xenobióticos. A subfamília CYP2C corresponde a aproximadamente 20% de todo o conteúdo de enzimas P450 nos microsomas hepáticos, sendo que a enzima CYP2C9 é a mais abundante (Goldstein e cols., 1994).

O citocromo P450 2C9 (*CYP2C9*) é uma enzima de primeira fase, que junto com cofatores apropriados, tais como NADPH, que fornece elétrons por via da redutase do citocromo P450, metaboliza compostos químicos pela quebra de moléculas de oxigênio. O composto a ser metabolizado recebe um grupamento hidroxila, enquanto o outro átomo de oxigênio é inserido em uma molécula de água (Degtyarenko & Archakov, 1993).

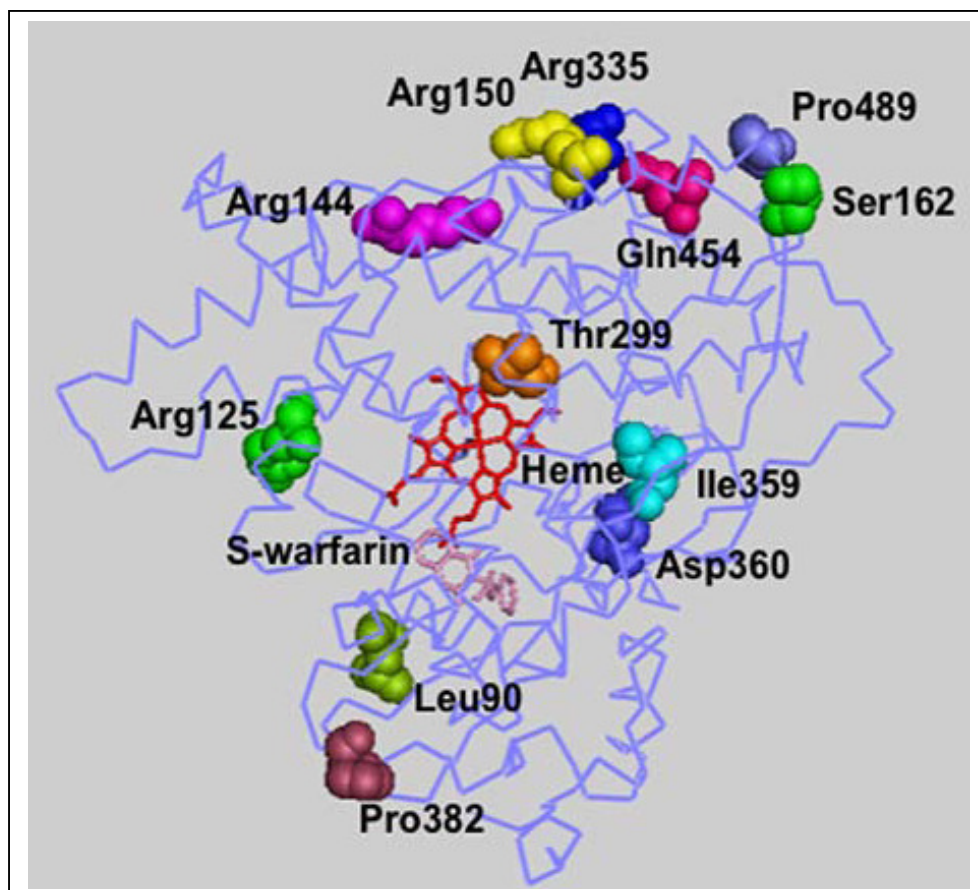
A atividade da enzima *CYP2C9* é codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossomo 10q24 (figura 6) juntamente com outros genes da subfamília *CYP2C* (*CYP2C18*, *CYP2C19* e *CYP2C8*), formando um grupo de aproximadamente 500 kb (Gray e cols., 1995).

Figura 6: Localização do gene *CYP2C9* no cromossomo 10q24, baseado no mapa do genoma humano www.ncbi.nlm.nih.gov (Adaptado de Yasar e cols, 2002). Os polimorfismos de cada gene são ilustrados pelos riscos em preto.



O gene *CYP2C9* tem tamanho maior do que 55 kb (kilobases) (Meehan e cols., 1988), e consiste de nove éxons, que codificam uma proteína de 490 aminoácidos (Goldstein e cols., 1994). Este gene é polimórfico, já tendo sido descritos até o momento 34 alelos variantes, sendo que boa parte deles codifica uma enzima com atividade reduzida (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee - www.imm.ki.se/CYPalleles). O alelo com maior frequência é considerado a forma selvagem do gene e designado *CYP2C9*1* (Romkes e cols., 1991). A figura 7 ilustra alguns dos polimorfismos caracterizados pela substituição do aminoácido expresso na forma selvagem do gene. As substituições que ocorrem nas posições Arg144Cys, Ile359Leu, Asp360Glu e Arg335Trp, são denominadas como alelos variantes *CYP2C9*2* (Rettie e cols., 1994), *CYP2C9*3* (Sullivan-Klose e cols., 1996), *CYP2C9*5* (Dickmann e cols., 2001) e *CYP2C9*11* (Higashi e cols., 2002), respectivamente. Esses polimorfismos já demonstraram reduzir de forma significativa a atividade da enzima (Yin e cols., 2006). Além disso, as variações *CYP2C9*2* e **3* são as mais frequentes em diversas populações (Suarez-Kurtz, 2005). Em virtude disso, os polimorfismos *CYP2C9*2*, **3*, **5* e **11* foram investigados neste trabalho.

Figura 7: Polimorfismos não silenciosos mapeados na estrutura cristal da enzima CYP2C9. O sítio de ligação da enzima com o substrato S-warfarina é mostrado em rosa (Yin e cols., 2006).



Diversos estudos populacionais de genotipagem de *CYP2C9* têm sido realizados a fim de caracterizar a distribuição dos múltiplos genótipos entre indivíduos de diferentes origens étnicas. Suarez-Kurtz (2005) apresenta um resumo dos dados obtidos a partir dos estudos mais abrangentes de caracterização dos alelos *CYP2C9**2, *3 e *5, incluindo dados de frequência de brasileiros saudáveis. De acordo com a tabela 3, verificamos que aproximadamente um terço das populações europeias (Taube e cols., 2000, Scordo e cols., 2001, Garcia-Martin e cols., 2001 e Yasar e cols., 1999), euro-americanas (Dickmann e cols., 2001), turcas (Aynacioglu e cols.,

1999), egípcias (Hamdy e cols., 2002) e brasileiros autodefinidos com a cor da pele branca ou parda (Vianna-Jorge e cols., 2004) apresentam pelo menos um alelo *CYP2C9*2* ou **3*. Ao contrário, a ocorrência destes alelos variantes é mais baixa em indivíduos africanos etíopes (Scordo e cols., 2001), afro-americanos (Dickmann e cols., 2001 e Sullivan-Klose e cols., 1996), brasileiros autodefinidos com a cor da pele preta (Vianna-Jorge e cols., 2004), americanos descendentes de mexicanos (Llerena e cols., 2004), índios nativos canadenses (Gaekigk e cols., 2001) e indivíduos da Ásia oriental (Sullivan-Klose e cols., 1996, Nasu e cols., 1997, Wang e cols., 1995 e Yoon e cols., 2001). A frequência destes alelos é nula em indivíduos do oeste da África (Allabi e cols., 2003) e o alelo *CYP2C9*2* jamais foi encontrado em indivíduos da Ásia oriental.

A ocorrência do variante *CYP2C9*5* é mais rara, sendo identificada entre africanos tanzanianos, beninenses e em afro-americanos com frequência alélica de 0,8% (Yasar e cols., 2002), 1,8% (Allabi e cols., 2003) e 1,7% (Dickmann e cols., 2001), respectivamente. Em 140 euro-americanos (Dickmann e cols., 2001), 121 belgas (Allabi e cols., 2003), 400 suecos (Yasar e cols., 2002), 300 coreanos (Yasar e cols., 2002) e 300 etíopes (Yasar e cols., 2002), não foi identificado nenhum indivíduo *CYP2C9*5*. Até o início deste estudo, na população brasileira, havia sido identificado apenas um indivíduo heterozigoto *CYP2C9*1/*5*, autodefinido com a cor da pele branca. A ocorrência deste polimorfismo, característico de populações africanas em um brasileiro autodefinido como branco, reflete a extensa miscigenação da nossa população (Suarez-Kurtz e cols., 2005).

O alelo *CYP2C9*11* ocorre em aproximadamente 1% das populações européias e afro-americanas (Allabi e cols., 2003; Tai e cols., 2005), enquanto que em beninenses a frequência é de 2,7% (Allabi e cols., 2003). Até o início deste estudo não existiam dados de frequência do polimorfismo *CYP2C9*11* na população brasileira.

Tabela 3: Distribuição populacional de polimorfismos genéticos de *CYP2C9* (alelos *CYP2C9**2, *3, *5 e *11) entre diferentes grupos populacionais. (Adaptado de Suarez-Kurtz, 2005). Os dados estão representados em percentagem (%), com a maior e a menor frequência encontrada.

Grupo Populacional	*2	*3	*5	*11 ^a
Europa (Britânicos, Italianos, Espanhóis e Suecos)	11 - 16	7,4 - 9,8	0	0,4 - 1
África				
Beninenses e Tanzanianos	0	0	0,8 - 1,8	2,7
Etíopes	4,3	2,3	0	-
Egípcios	12	6	-	-
Ásia				
Oriente (Taiwaneses, Japoneses, Chineses, Coreanos)	0	1,1 - 4,9	0	-
Turcos	11	10	-	-
América do Norte				
Euro-Americanos	8 - 15	4,3 - 7	0	-
Afro-Americanos	1 - 2,5	0,5 - 1,3	1,7	1
Americanos Mexicanos	8	6	0	-
América do Sul				
Brasileiros autodefinidos brancos	12	8,1	-	-
Brasileiros autodefinidos pardos	7,2	6,8	-	-
Brasileiros autodefinidos pretos	4,5	3,2	-	-

- polimorfismo não investigado

^aDados obtidos de Allabi e cols., 2003 e Tai e cols., 2005.

Recentemente, foram descritos polimorfismos na região promotora, nos íntrons e na região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene *CYP2C9* em diferentes populações (Shintani e cols., 2001; Morin e cols., 2004; Zhao e cols., 2004 e King e cols., 2004), resultando em 10 haplótipos diferentes (tabela 4). Os novos polimorfismos ocorrem juntamente com outras variações que já foram descritas anteriormente nos éxons e que já mostraram interferência significativa na atividade da enzima. Os polimorfismos de regiões não codificantes do gene *CYP2C9*, sozinhos não afetam a atividade da enzima (King e cols., 2004 e Veenstra e cols., 2005). Além disso, os principais haplótipos que influenciam de forma significativa na capacidade metabólica da enzima *CYP2C9*, é o haplótipo que apresenta o alelo *CYP2C9**2 (Arg144Cys) (Veenstra e cols., 2005) ou *CYP2C9**3 (Ile359Leu) (Schwarz, 2003; Morin e cols., 2004, Zhao e cols., 2004 e Veenstra e cols., 2005).

Tabela 4: Haplótipos *CYP2C9* (Adaptado de Ingelman-Sundberg e cols 2005).

Alelo	Haplótipo	Frequência (%)	Referências
<i>CYP2C9*1A</i>	Nenhum	59	King e cols., 2004
<i>CYP2C9*1B</i>	-2665delT, -2664delG, -1188T>C	10	King e cols., 2004
<i>CYP2C9*1C</i>	-1188T>C	7,5	Shintani e cols., 2001 e King e cols., 2004
<i>CYP2C9*1D</i>	-2665delT, -2664delG	1,6	King e cols., 2004
<i>CYP2C9*2A</i>	430C>T; -1188T>C, -1096A>G; -620G>T; -485T>A; -484C>A; 3608C>T	10	Takahashi e cols., 2004; Sandberg e cols., 2004 e King e cols., 2004
<i>CYP2C9*2B</i>	430C>T; -2665delT, -2664delG, -1188T>C;- 1096A>G; -620G>T; -485T>A; -484C>A;3608C>T	1,6	King e cols., 2004
<i>CYP2C9*2C</i>	430C>T; -1096A>G;-620G>T; -485T>A; -484C>A; 3608C>T	0,3	King e cols., 2004
<i>CYP2C9*3A</i>	1075A>C; -1911T>C;-1885C>G; -1537G>A; -981G>A; 42614A>C	2	Shintani e cols., 2001 e King e cols., 2004
<i>CYP2C9*3B</i>	1075A>C;-1911T>C; -1885C>G; -1537G>A; - 1188T>C; -981G>A; 42614A>C	6,2	Shintani e cols., 2001 e King e cols., 2004
<i>CYP2C9*11A</i>	1003C>T; 42542C>T	0,6	Blaisdell e cols., 2004 e King e cols., 2004
<i>CYP2C9*11B</i>	1003C>T;-2665delT, -2664delG,1188T>C,2542C>T	0,3	King e cols., 2004

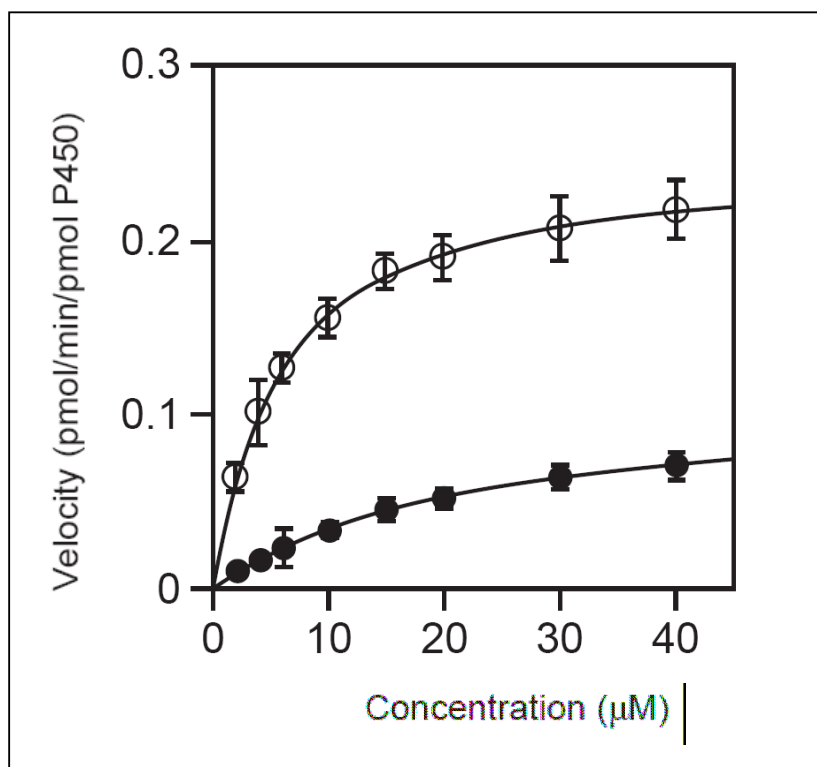
A enzima CYP2C9 é responsável pelo metabolismo de xenobióticos (Miners e cols., 1998) e numerosos agentes clinicamente relevantes (Rettie e cols., 2005), como: os antiinflamatórios não-esteroidais (Kirchheiner e cols., 2002; Lee e cols., 2003; Vianna-Jorge e cols., 2004; Perini e cols., 2005; Perini e cols., 2006); os hipoglicemiantes tolbutamida (Relling e cols., 1990), glipizida (Kidd e cols., 1999), gliburida (Kirchheiner e cols., 2002), glimepirida (Niemi e cols., 2002), e nateglinida (Kirchheiner e cols., 2004); o anticonvulsivante fenitoína (Veronese e cols., 1991); os antihipertensivos losartan (McCrea e cols., 1999) e irbesartano (Bourrie e cols., 1999); o antidepressivo amitripirilina (Ghahramani e cols., 1997), fármacos usados na terapia de hipercolesterolemia como a fluvastatina (Fischer e cols., 1999 e Kirchheiner e cols., 2003) e finalmente os anticoagulantes orais S-warfarina (Rettie e cols., 1992; Kaminsky e cols., 1997; Palkimas e cols., 2003) e S-acenocumarol (Thijssen e cols., 2000).

A atividade da enzima CYP2C9 é modulada por polimorfismos genéticos, o que implica em alterações metabólicas de seus substratos. Estudos *in vitro* e *in vivo* com o substrato S-warfarina, já demonstraram que os polimorfismos estudados neste trabalho (*CYP2C9**2, *3, *5 e *11) reduzem de forma significativa a atividade da enzima CYP2C9 (Rettie e cols., 1994; Yamazaki e cols., 1998; Takanashi e cols., 2000; Dickmann e cols., 2001; Palkimas e cols., 2003; Tai e cols., 2005; Kirchheiner e cols., 2005; Veenstra e cols., 2005; Yin e cols., 2006; Lindh e cols., 2009).

Um conjunto de resultados *in vitro*, obtidos a partir da expressão heteróloga das formas *CYP2C9**1, *2, *3, *5 ou *11 em diversos tipos celulares, indicam que as formas variantes (*CYP2C9**2, *3, *5 ou *11) apresentam redução significativa da 7'-hidroxilação de S-warfarina (Takanashi e cols., 2000; Lee e cols., 2002; Dickmann e cols., 2001; Tai e cols., 2005). Ao comparar apenas o efeito da variação *CYP2C9**3 sobre a metabolização *in vitro* do substrato S-

warfarin (figura 8), observa-se uma redução da depuração intrínseca (CL_{int}) de aproximadamente oito vezes (Takanashi e cols., 2000).

Figura 8: O gráfico de Michaelis-Menten representa a 7-hidroxilação de S-warfarina em leveduras expressando a isoforma selvagem (círculos abertos) e isoforma *CYP2C9*3* (círculos fechados). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão em três diferentes experimentos (Adaptado de Takanashi e cols., 2000).



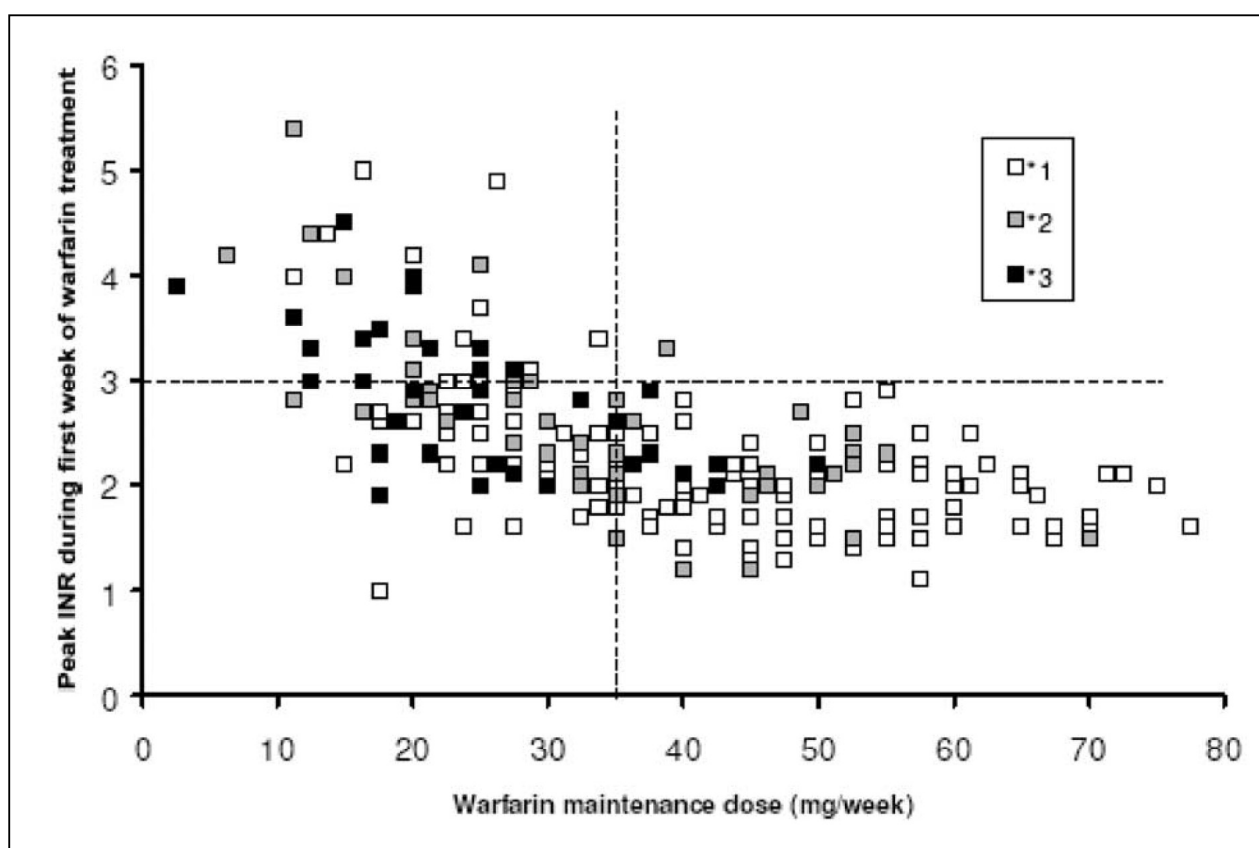
Existe uma extensa literatura de estudos *in vivo*, que correlacionam genótipos *CYP2C9* com reduções significativas no metabolismo e/ou na dose diária requerida do anticoagulante oral warfarina (Schwarz, 2003; Palkimas e cols., 2003; Kirchheiner e cols, 2005; Yin e cols., 2006; Gage, 2006; Wadelius e cols., 2007; Hill e cols., 2008; Becquemont, 2008; Stehle e cols., 2008;

D'Andrea e cols., 2008; Kim e cols., 2009; Lindh e cols., 2009). Além disto, pacientes que apresentam polimorfismos *CYP2C9* são significativamente mais suscetíveis a efeitos adversos, particularmente durante a terapia inicial com warfarina (Aithal e cols., 1999; Higashi e cols., 2002; Lindh e cols., 2005; Kirchheiner e cols., 2005; Lima e cols., 2008; Limdi e cols., 2009).

A dose requerida de warfarina para atingir o INR terapêutico é significativamente menor em pacientes que apresentam pelo menos um alelo variante *CYP2C9**2, *3, *11 (Tai e cols., 2005; Yin e cols., 2006; D'Andrea e cols., 2008; Lindh e cols., 2009). Em 2005, Lindh e colaboradores, mostraram a relação entre a presença dos alelos *CYP2C9**2 e *3, a alta sensibilidade à coagulação e a baixa dose de manutenção de warfarina (figura 9). A alta prevalência de pacientes que apresentam alelos variantes *2 ou *3, requerendo doses semanais de warfarina significativamente menores, além de um alto INR inicial está ilustrada na figura 9 (Lindh e cols., 2005).

Ao iniciarmos este estudo, não havia dados na literatura quanto à distribuição dos alelos *CYP2C9**2, *3,*5 e *11, bem como às conseqüências destes polimorfismos na dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros que fazem uso crônico deste anticoagulante. Lima e colaboradores (2008), em um estudo que correlaciona genótipos *CYP2C9* e a qualidade do controle anticoagulante, descreveram apenas a frequência dos alelos *CYP2C9**2 (9,7%) e *3 (7,3%) em pacientes brasileiros em terapia inicial com warfarina. Devido ao aumento significativo do risco de sangramento em pacientes brasileiros apresentando os alelos *CYP2C9**2 ou *3 (Lima e cols., 2008), é de se supor uma grande influência dos polimorfismos genéticos de *CYP2C9* na dose requerida de warfarina em pacientes que fazem uso crônico do anticoagulante.

Figura 9: Medida máxima de INR durante a primeira semana de tratamento em função da dose semanal requerida de warfarina para atingir três medidas consecutivas de INR dentro do alvo terapêutico. A linha pontilhada horizontal indica o limite máximo de INR terapêutico, enquanto que a linha pontilhada vertical representa a dose média de warfarina (Lindh e cols., 2005).



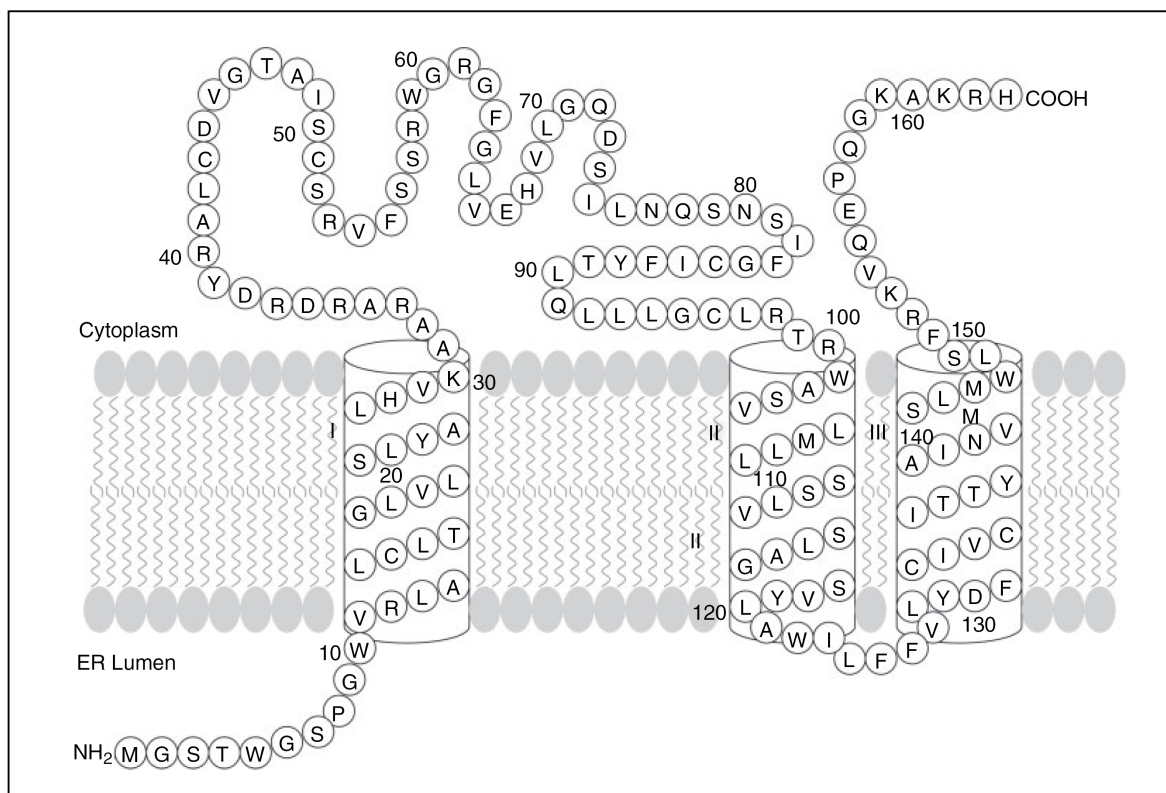
1.4. ENZIMA VITAMINA K EPÓXIDO REDUTASE

Atividade da enzima vitamina K epóxido redutase (VKOR) foi descrita pela primeira vez em 1974 (Zimmerman e cols., 1974). Sua função é reciclar a vitamina K 2,3-epóxido e reduzi-la em vitamina K quinona e, em seguida, em hidroquinona na membrana do retículo endoplasmático (Cain e cols., 1997; Tie e cols., 2008). A vitamina K hidroquinona atua como um cofator na

conversão do ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico pela enzima GGCX, que é responsável pela ativação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K (Buitenhuis e cols., 1990). O alvo dos anticoagulantes orais como, por exemplo, a warfarina, é a enzima VKOR. A warfarina reduz significativamente as concentrações de vitamina K hidroquinona e conseqüentemente diminui a ativação dos fatores de coagulação que dependem deste cofator (Palkimans e cols., 2003; Oldenburg e cols., 2007; Tie e cols., 2008).

A enzima VKOR é codificada pelo gene *VKORC1* identificado em 2004, simultaneamente por dois grupos independentes (Li e cols., 2004 e Rost e cols., 2004). O gene *VKORC1* tem um tamanho de 5kb e está localizado no cromossomo 16p11.2 (Stafford, 2005). Tie e colaboradores (2005) propuseram a estrutura topológica da proteína codificada pelo gene *VKORC1*, conforme ilustrado na figura 10. Esta proteína de membrana é composta de 163 aminoácidos e apresenta três domínios transmembranares. O amino terminal está localizado no lúmen do retículo endoplasmático, enquanto a carboxila terminal está exposta no citoplasma (Stafford, 2005; Oldenburg e cols., 2007; Tie e cols., 2008). O sítio de ligação da warfarina está presente na terceira hélice transmembranar, localizado no resíduo 139 (tirosina), podendo ser visualizado na figura 10 (Tie e cols., 2008).

Figura 10: Topologia da enzima vitamina K epóxido redutase (Stafford, 2005).



O gene *VKORC1* é polimórfico, já tendo sido descritos polimorfismos em regiões codificantes (Rost e cols., 2004; Harrington e cols., 2005; Bodin e cols., 2005), na região promotora, nos íntrons e na região 3' UTR (Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005). Contudo, para a farmacogenética dos anticoagulantes orais, 10 polimorfismos (381T>C, 861C>A, 3673G>A, 5808T>G, 6009C>T, 6484C>T, 6853G>C, 7566C>T, 8773C>T e 9041G>A), que ocorrem em regiões não codificantes apresentam um interesse farmacológico especial. Esses alelos variantes estão em desequilíbrio de ligação e formam dois grandes grupos haplotípicos, relacionados a baixas (haplotipo A) e altas (haplotipo B) doses de warfarina (Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Veenstra e cols., 2005; Mushiroda e cols., 2006; Marsh e cols., 2006; Yin e cols., 2006).

Recentemente, Perini e colaboradores (2008) descreveram a frequência de quatro alelos de interesse no gene *VKORC1* (3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A), em índios e compararam com dados descritos em diferentes populações (tabela 5). A frequência destes alelos ocorre em torno de 40% dos europeus, euro-americanos e ameríndios, com exceção do polimorfismo 5808T>G, que apresenta uma frequência menor em europeus e euro-americanos (aproximadamente 20%), sendo praticamente nula em índios brasileiros (Sconce e cols., 2005; Geisen e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Marsh e cols., 2006; Schelleman e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008; Perini e cols., 2008), assim como em africanos, afro-americanos, asiáticos e peruanos (Marsh e cols., 2006). Em mexicanos, a frequência do alelo 5808T>G é de 13%, enquanto que os alelos 6853G>C e 9041G>A ocorrem em aproximadamente 50% da população (Marsh e cols., 2006). Africanos e afro-americanos apresentam uma frequência alélica em torno de 10%, 20% e 48% para os polimorfismos 3673G>A, 6853G>C e 9041G>A, respectivamente (Geisen e cols., 2005; Takahashi e cols., 2006; Marsh e cols., 2006; Schelleman e cols., 2007). Em asiáticos, os alelos 3673G>A e 6853G>C são extremamente frequentes (em torno de 90%), enquanto que o alelo 9041G>A ocorre em no máximo 17% da população (Geisen e cols., 2005; Yuan e cols., 2005; Takahashi e cols., 2006; Marsh e cols., 2006; Obayashi e cols., 2006).

Tabela 5: Comparação da frequência alélica de *VKORC1* em diferentes populações^a (Adaptado de Perini e cols., 2008).

População	3673A	5808G	6853C	9041A
Europeus e Euro-americanos	34 - 47	21 - 23	37 - 42	30 - 45
Africanos e Afro-americanos	10	0 - 6	14 - 25	46 - 52
Asiáticos ^b	89 - 91	0	89 - 95	13 - 17
Mexicanos	-	13	49	46
Peruanos	-	2	31	62
Brasileiros Ameríndios ^c	40 - 57	0 - 3	43 - 63	34 - 54

^aFrequência mínima e máxima encontrada em %

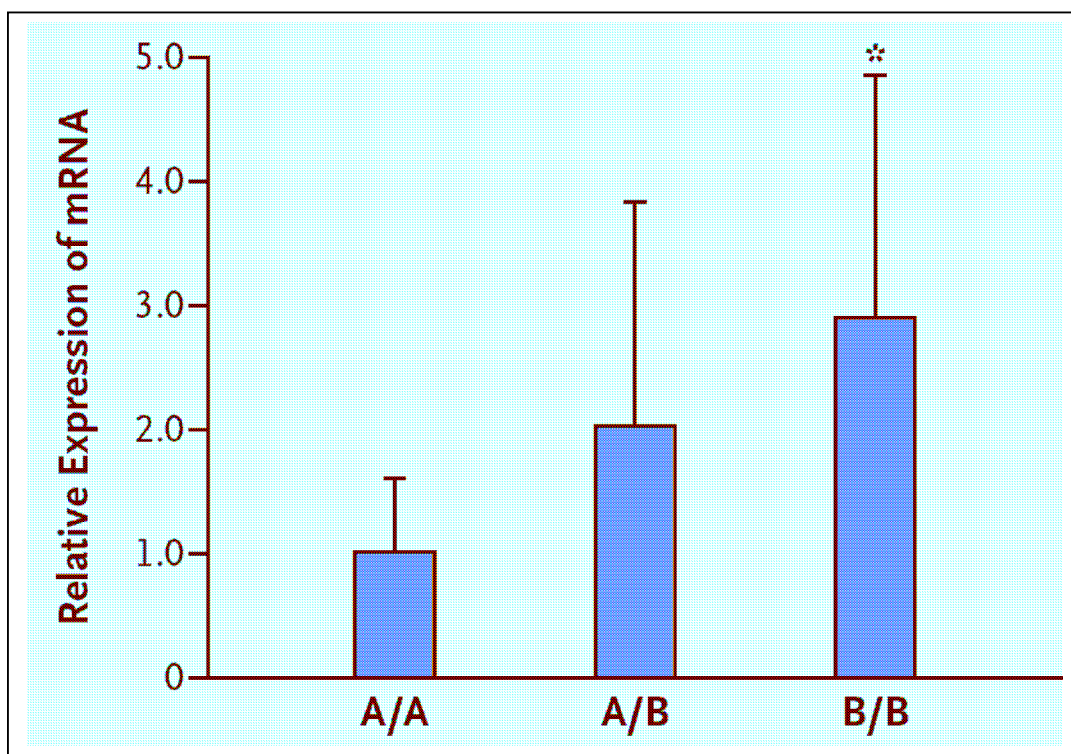
^bJaponeses e Chineses

^cGuarani e Kaingang

Dentre os polimorfismos descritos acima, o 3673G>A, é considerado o alelo com maior poder preditivo da dose requerida de warfarina (Rieder e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Lee e cols., 2006; Schelleman e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008; Wang e cols., 2008). Além de ocorrer em forte desequilíbrio de ligação com outros alelos de interesse farmacogenético, o polimorfismo 3673G>A ocorre na região promotora do gene *VKORC1* e altera a sequência consenso E-box, provocando a diminuição de expressão do RNA mensageiro (mRNA) de *VKORC1* (Yuan e cols., 2005 e Wang e cols., 2008). O haplótipo que inclui o alelo 3673A (haplótipo A), e que está relacionado a baixas doses requeridas de warfarina, é caracterizado por apresentar uma baixa expressão do mRNA de *VKORC1*, conforme

ilustrado na figura 11. Em contrapartida, a expressão do mRNA de *VKORC1* é 3 vezes maior para o haplótipo B, que inclui o alelo 3673G e está associado a altas doses de warfarina (Rieder e cols., 2005).

Figura 11: Correlação entre diferentes grupos haplotípicos (AA, AB e BB) e a expressão do mRNA de *VKORC1*. Foram analisadas 53 amostras de microsomas hepáticas (seis A/A, vinte e dois A/B e vinte e cinco B/B) (Rieder e cols., 2005).



Até o início deste estudo, não havia dados na literatura quanto à distribuição dos alelos *VKORC1* 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A, nem mesmo o impacto destes polimorfismos na dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros. Baseado na extensa literatura que relata a contribuição de variações genéticas de *VKORC1* na terapia com

anticoagulantes orais em diferentes populações (Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Lee e cols., 2006; Yin e cols., 2006; Gage, 2006; Lal e cols., 2006; Schelleman e cols., 2007; Wadelius e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008; Hill e cols., 2008; Becquemont, 2008; Stehle e cols., 2008; D'Andrea e cols., 2008; Kim e cols., 2009; Lindh e cols., 2009), é de se supor uma forte influência destes alelos na dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros.

1.5. ALGORITMOS QUE ESTIMAM A DOSE REQUERIDA DE WARFARIN

Existem marcantes diferenças individuais na sensibilidade à *warfarina*, e a necessidade de doses individualizadas tornou-se um problema comum na prática médica diária. O FDA aprovou o uso de testes genéticos na terapia com o anticoagulante oral warfarina ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2\[1\].pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s1051blv2[1].pdf)), e com isto, tornou-se necessário o estabelecimento correto da dose terapêutica individualizada de warfarina, baseada tanto em fatores genéticos (polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*), quanto clínicos (idade, sexo, superfície corpórea, valor de INR, uso concomitante de medicações, severidade e tipo de doença).

Diversos estudos populacionais têm sido realizados a fim de desenvolver um algoritmo para estimar a dose requerida de warfarina em pacientes de diferentes origens étnicas (Gage e cols., 2004; Sconce e cols., 2005; Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Carlquist e cols., 2006; Aquilante e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Lee e cols., 2006; Lal e cols., 2006; Obayashi e cols., 2006; Tham e cols., 2006; Kimura e cols., 2007; Millican e cols., 2007; Momary e cols., 2007; Zhu e cols., 2007; Caldwell e cols., 2007; Schelleman e cols., 2007;

Wadelius e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008; Ozgon e cols., 2008; Schelleman e cols., 2008; Hill e cols., 2008; Becquemont, 2008; Stehle e cols., 2008; D'Andrea e cols., 2008; Lindh e cols., 2009; Limdi e cols., 2009). Em revisão recente, Kim e colaboradores (2009), apresentaram um resumo dos dados obtidos a partir dos estudos mais abrangentes de análise de regressão linear múltipla para estimar a contribuição de variáveis genéticas e não genéticas em pacientes que fazem uso de warfarina. Nos diferentes grupos étnicos, o poder preditivo dos algoritmos desenvolvidos (tabela 6), expressos pelo coeficiente de correlação (r^2), varia entre 0,21 (Schelleman e cols., 2007) e 0,79 (Millican e cols., 2007).

Tabela 6: Contribuição de variáveis genéticas e não genéticas na dose requerida de warfarina em diferentes populações (Adaptado de Kim e cols., 2009).

População	Coeficiente de correlação (r^2)
Europeus e Euro-americanos	0,21 – 0,79
Africanos e Afro-americanos	0,31 – 0,37
Asiáticos	0,33 – 0,65

Ao iniciarmos este estudo, não havia dados na literatura quanto à contribuição de variáveis genéticas e não genéticas na dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros em terapia com este anticoagulante. Devido à discordância no poder preditivo dos algoritmos desenvolvidos para diferentes populações, é essencial o desenvolvimento de um algoritmo

específico para pacientes brasileiros, já que a nossa população é extremamente heterogênea, resultado de uma mistura de populações fundadoras ameríndias, européias, africanas, com uma pequena contribuição asiática mais recente (Parra e cols., 2003; Suarez-Kurtz, 2005; Suarez-Kurtz e cols., 2007; Suarez-Kurtz, 2008).

2. OBJETIVOS

- Genotipar os alelos variantes *CYP2C9**2, *3, *5 e *11 em pacientes brasileiros que fazem uso crônico do anticoagulante oral warfarina.
- Determinar a frequência alélica, genotípica e haplotípica dos polimorfismos de *VKORC1* (3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A), em pacientes com uso crônico de warfarina.
- Avaliar a existência de influência dos genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1* na dose requerida de warfarina, que é metabolizada pela enzima *CYP2C9* e age inibindo a enzima *VKOR*.
- Desenvolver algoritmos envolvendo variáveis genéticas (polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas (idade, sexo, peso, valor de INR, uso concomitante de medicações, tipo da doença), a fim de estimar a dose requerida de warfarina em pacientes em terapia com o anticoagulante warfarina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto (anexo I) foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (anexo II) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras - INCL (anexo III).

3.1. AMOSTRAGEM POPULACIONAL ESTUDADA

O estudo foi realizado em 390 pacientes que estão em tratamento com o anticoagulante oral warfarina, no ambulatório de coagulação do INCL. Esses indivíduos foram convidados a participar do estudo no momento em que compareceram ao ambulatório do hospital para suas consultas de rotina.

Todos os voluntários do presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo IV) e receberam o Questionário de Identificação (anexo V), que visa a obtenção de dados demográficos e informações quanto à ancestralidade. A natureza tri-híbrida da população brasileira, a partir dos ameríndios, europeus e africanos, é um fator limitante para a caracterização dos brasileiros quanto à etnia, em face da complexa miscigenação (Pena e cols., 2000). Apesar das dificuldades extensamente documentadas (Suarez-Kurtz, 2005; Suarez-Kurtz e cols., 2007; Suarez-Kurtz, 2008), os voluntários participantes deste estudo foram classificados em três grupos, de acordo com a cor da pele, por autoclassificação: brancos, pretos e pardos; conforme o esquema adotado no Censo Brasileiro 2007 (<http://censos2007.ibge.gov.br>).

Os dados demográficos e clínicos dos 390 pacientes são mostrados na tabela 7. Para cada paciente, a dose de warfarina administrada foi ajustada pelo médico responsável, baseada na medida de INR, realizada no dia da consulta. A informação completa da dose semanal de warfarina requerida por cada paciente foi obtida do prontuário e definida como a primeira dose prescrita durante três consultas consecutivas em que o paciente apresentou o INR terapêutico (2,5 a 3,5 para pacientes com prótese cardíaca, e 2 a 3 para o restante das indicações terapêuticas).

Tabela 7: Dados demográficos e clínicos dos 390 pacientes participantes do estudo.

Variável	n=390
Idade (anos)	54 (18 – 91) ^a
Peso (kg)	69,0 (34,0 – 117,5) ^a
Dose de warfarina (mg/semana)	31,4 (5,0 – 75,0) ^a
Sexo	n (%)
Homens	186 (48%)
Mulheres	204 (52%)
Fumo	
Fumantes	17 (4,4%)
Ex-fumantes	155 (39,7%)
Não fumantes	218 (55,9%)
Cor da pele por autodefinição	
Branco	196 (50,3%)
Pardo	118 (30,2%)
Preto	76 (19,5%)
Indicação do tratamento com warfarina	
Prótese de válvula cardíaca	156 (40,0%)
Fibrilação Atrial	135 (34,6%)
Fibrilação Atrial e Prótese de válvula cardíaca	70 (18,0%)
Doença tromboembólica	20 (5,1%)
Outros	9 (2,3%)
Doenças concomitantes ^b (n = 296)	
Hipertensão	245 (62,8%)
Febre reumática	100 (25,6%)
Diabetes	30 (7,7%)
Medicações concomitantes ^b (n=330)	
Furosemida	152 (39,0%)
Digoxina	120 (30,8%)
Captopril	118 (30,0%)
Beta bloqueadores (atenolol, carvedilol, propranolol)	97 (24,9%)
Amiodarona	61 (15,6%)
Losartan / Candesartan	41 (10,5%)
Spironolactona	40 (10,3%)
Enalapril	40 (10,3%)
Penicillina G	34 (8,7%)
Simvastatina	31 (7,9%)
Isosorbida	23 (5,9%)
Aspirina	22 (5,6%)
Hidroclorotiazida	22 (5,6%)
Antagonistas de Cálcio (diltiazem, verapamil)	20 (5,1%)

^aMédia (mínimo e máximo).

^bMesmo paciente pode apresentar mais de uma doença ou medicação concomitante.

3.2. COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Após a obtenção do consentimento informado, as amostras de sangue (3 ml) para extração do DNA foram obtidas no momento da coleta de rotina para determinação do INR. O sangue dos pacientes foi coletado em tubo a vácuo, com EDTA (BD, Minas Gerais, Brasil), e em seguida encaminhado para a etapa de extração do DNA na Divisão de Farmacologia do INCa. A extração foi realizada utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico GFX (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria (espectrofotômetro Beckman DU 640). As amostras de cada voluntário foram colocadas em tubos eppendorf de 1,5 ml, devidamente etiquetadas com o código interno do voluntário e a data de extração. Em seguida, foram armazenadas em geladeira (4 a 8°C) para posteriores análises genotípicas.

3.3. ANÁLISE DOS ALELOS *CYP2C92, *3, *5 E *11**

Para a análise dos alelos *CYP2C9**2, *3, *5 e *11, foi realizada a amplificação do fragmento de interesse, utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), a partir de oligos específicos, conforme demonstrado na tabela 8 (Sullivan-Klose e cols., 1996 e Allabi e cols., 2003).

As reações de PCR foram geradas pela Taq polimerase (Invitrogen, SP, Brasil) utilizando-se um termociclador (PTC-200 MJ) nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 50 segundos, temperatura de anelamento a 55°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 50 segundos, repetindo-se em 35 ciclos; anelamento final a 72°C por 5 minutos.

O protocolo das reações de PCR para a amplificação das regiões de interesse está descrito na tabela 9, com as respectivas concentrações dos reagentes.

Tabela 8: Lista dos oligos utilizados nas reações de PCR

Ensaio	Tipo	Sequência
CYP2C9*2	Senso (2S)	5'-TACAAATACAATGAAAATATCATG-3'
	Reverso (2R)	5'-CTAACAACCAGACTCATAATG-3'
CYP2C9*3, *5 e *11	Senso (3S)	5'-CTCCTTTTCCATCAGTTTTTACT-3'
	Reverso (3R)	5'- GAAGTCCCCAAATTCATAGTATC-3'

Tabela 9: Concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR para cada ensaio.

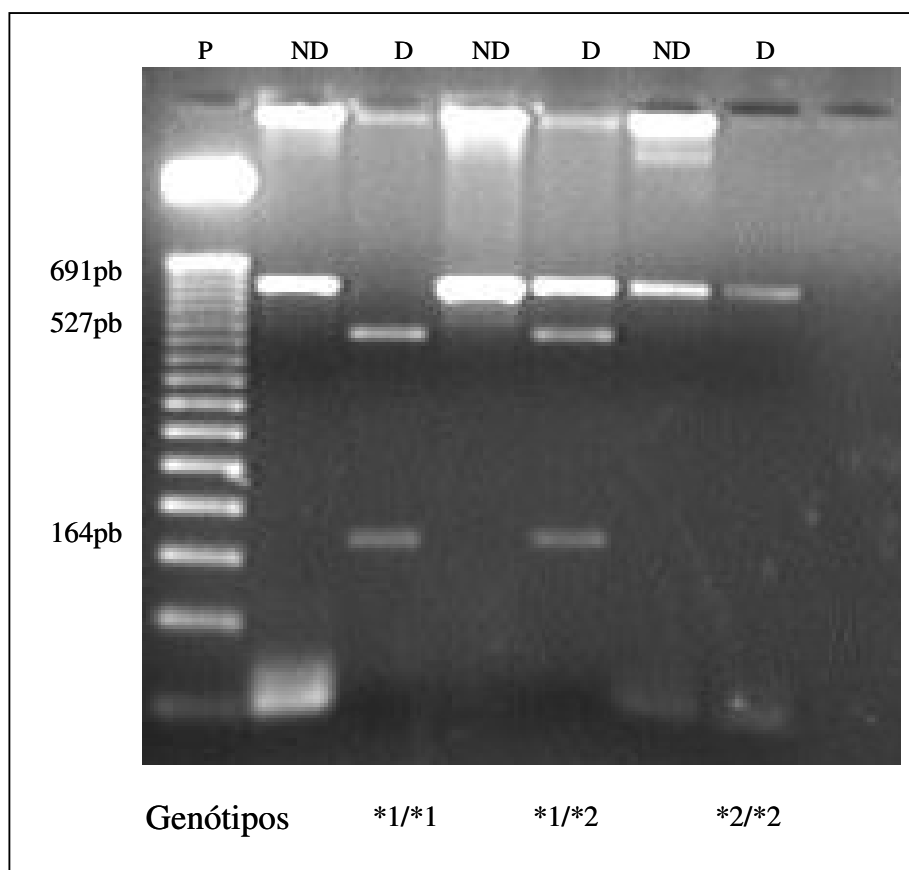
Reagentes	<i>CYP2C9*2</i>	<i>CYP2C9*3, *5 e *11</i>
DNA (ng)	200	200
dNTP (μ M)	200	200
Tampão	1X	1X
MgCl ₂ (mM)	3	3
Primer reverso (μ M)	0,25	0,25
Primer senso (μ M)	0,25	0,25
Taq polimerase (U)	2,5	2,5
Volume final (μ l)	50	50

Após a amplificação do produto de PCR, a caracterização do alelo *CYP2C9*2* foi feita com base no perfil de digestão por endonuclease específica (Sullivan-Klose e cols., 1996), utilizando a técnica RFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição). Todas as amostras foram digeridas com uma unidade de enzima a 37°C por 3 horas.

A região que contém a variação *CYP2C9*2* foi amplificada em um produto de tamanho igual a 691 pb. Após a digestão com a enzima Ava II (New England Biolabs, Herts, UK), que contém um sítio de restrição no alelo selvagem, as amostras que não apresentavam a variação (*CYP2C9*2*) produziram um fragmento com duas bandas (527 e 164 pb), enquanto que, na presença do alelo variante 430C>T, o sítio de restrição estava ausente, não ocorrendo, assim, a digestão (691 pb) (Sullivan-Klose e cols., 1996).

A visualização do tamanho dos fragmentos foi realizada comparando-a com um padrão de peso molecular (Invitrogen, Carlsbad – CA, USA) por eletroforese em gel de agarose 2%, conforme ilustrado na figura 12. Os géis foram corados com brometo de etídio (US Biological, USA), as bandas foram identificadas utilizando-se um transiluminador de luz ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas digitalmente utilizando o programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, USA).

Figura 12: Gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio e visualizado por um transiluminador de luz ultravioleta, representando o perfil de digestão com a enzima *AvaII* para caracterização do alelo *CYP2C9*2*. **P** corresponde ao padrão de peso molecular (50 pb); **ND** ao produto de PCR não digerido; **D** ao produto de PCR digerido com a enzima *AvaII*.



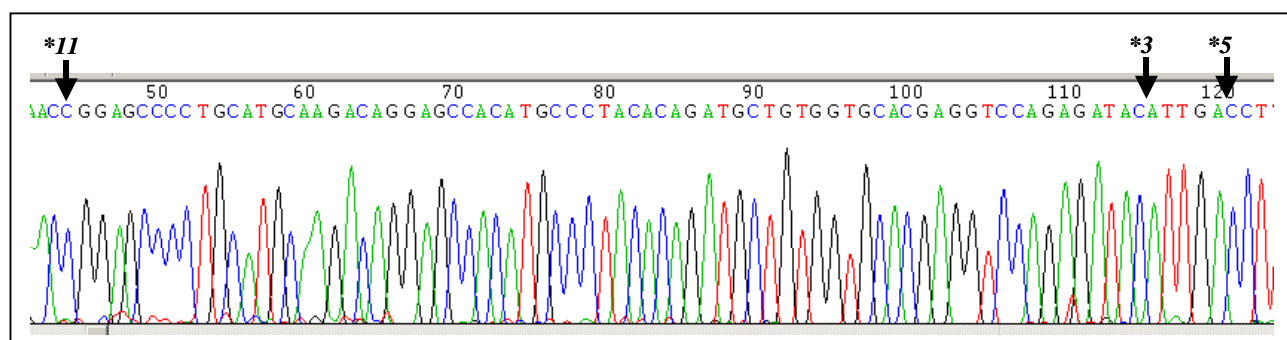
O fragmento do exon 7 (285 pb), que contém os alelos variantes *CYP2C9*3*, *5 e *11, foi amplificado conforme descrito anteriormente por PCR. Ao produto amplificado foi adicionado o oligo 3R ou 3S, solução para sequenciamento (BigDye® Terminator v3.1 sequencing ready reaction kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) e água (quantidade suficiente para 10 µl). Em

seguida, foram submetidas ao termociclador com a programação: 95°C por 30 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, repetindo-se em 36 ciclos.

As amostras eram precipitadas com isopropanol e etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), aplicava-se 10 µl de formamida (Applied Biosystems), e em seguida eram submetidas ao seqüenciador PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os polimorfismos foram identificados pelo exame direto dos picos do eletroesferograma (figura 13), confirmados com primer senso e reverso, e comparados com a seqüência selvagem encontrada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (número de acesso L16881).

Os indivíduos que não apresentaram nenhum dos alelos variantes (*CYP2C9**2, *3, *5 e *11) em seu genótipo foram considerados selvagens (*CYP2C9**1).

Figura 13: Sequenciamento da região do éxon 7 de *CYP2C9*, realizado com o primer reverso (3R). As setas indicam o local das variações *CYP2C9**3, *5 e *11



3.4. ANÁLISE DOS ALELOS *VKORC1* 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C E 9041G>A

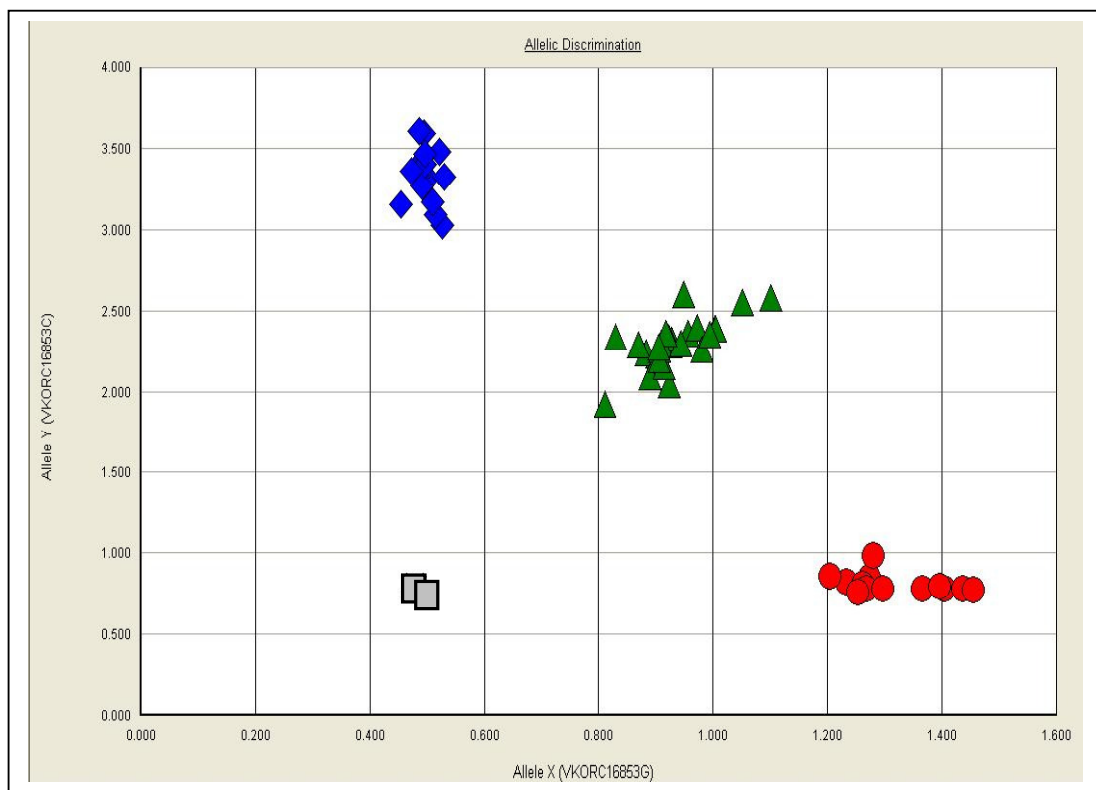
Os polimorfismos *VKORC1* 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A, foram identificados pela técnica de PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente por Perini e colaboradores (2008). Para os SNPs 3673G>A, 5808T>G e 9041G>A, foram desenhados ensaios com oligos e sondas específicos (tabela 10). Um ensaio pronto para detecção do SNP 6853G>C (C_2847860_10), foi obtido da Applied Biosystems. Para todos os ensaios, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 10 µl, com 30 ng de DNA, 1x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1x de cada ensaio de oligo e sonda, e H₂O q.s.p.

As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, acompanhados de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. A detecção dos alelos foi realizada após 1 minuto a 60°C no aparelho Fast 7500 Real-Time System (Applied Biosystems), e, em seguida, os genótipos foram determinados diretamente, conforme ilustrado na figura 14.

Tabela 10: Oligos e sondas utilizados no ensaio de fluorescência com TaqMan.

Polimorfismo	Oligos e sondas
3673G>A	Oligo senso: 5'-GGCCTCCCAAATGCTAGGATTATA-3'
	Oligo reverso: 5'-AAGTCAAGCAAGAGAAGACCTGAAA-3'
	Sonda 3673G: 5'-VIC-ATTGGCCGGGTGCG-3'
	Sonda 3673A: 5'-FAM-ATTGGCCAGGTGCG-3'
5808T>G	Oligo senso: 5'-GCGGTAGAGATTGACGATGGT-3'
	Oligo reverso: 5'-GCAGCCATCGCCAACAC-3'
	Sonda 5808T: 5'-VIC-CCCCTTCACCTGCGC-3'
	Sonda 5808G: 5'-FAM-CCCCTTCCCCTGCGC-3'
9041G>A	Oligo senso: 5'-GTCCCTAGAAGGCCCTAGATGT-3'
	Oligo reverso: 5'-GTGTGGCACATTTGGTCCATT-3'
	Sonda 9041G: 5'-FAM-ACCCGCACATGAC-3'
	Sonda 9041A: 5'-VIC-CATACCCACACATGAC-3'

Figura 14: Exemplo de determinação dos genótipos *VKORC1* 6853G>C por PCR em tempo real. Em azul, estão os indivíduos com genótipo homozigoto variante 6853CC; em verde, os heterozigotos 6853GC e, em vermelho, os homozigotos selvagens 6853GG. Em cinza, é mostrado o controle negativo.



3.5. MODELO DE REGRESSÃO MÚLTIPLA

As variáveis demográficas (idade, sexo, peso e cor da pele por autodefinição), clínicas (indicação do tratamento, medida de INR dividido pela dose estável, uso concomitante de medicações, doenças associadas e fumo) e genéticas (genótipos *VKORC1* 3673G>A e número de alelos variantes *CYP2C9**2, *3, *5 e *11) de cada paciente foram avaliadas inicialmente

individualmente. Para análise de regressão múltipla foram incluídas as variáveis que apresentaram um P menor que 0,15. Posteriormente, no algoritmo desenvolvido foram incluídas apenas as variáveis com P menor que 0,07 (idade, peso, indicação do tratamento, uso concomitante de amiodarona e sinvastatina, genótipos *VKORC1* 3673G>A, número de alelos variantes *CYP2C9**2, *3, *5 e *11, e medida de INR dividido pela dose estável).

A dose de warfarina estimada pelo algoritmo desenvolvido foi avaliada por três parâmetros estatísticos: erro sistemático ou tendenciosidade ($\text{bias} = \text{dose estimada} - \text{dose observada} / \text{dose observada} \times 100\%$), precisão ($\text{precisão} = | \text{dose estimada} - \text{dose observada} / \text{dose observada} \times 100\% |$) e pela diferença absoluta entre a dose real administrada no paciente e a estimada pelo algoritmo ($\text{AD mg/semana} = | \text{dose estimada} - \text{dose observada} |$).

A contribuição de cada variável analisada sob a dose requerida de warfarina foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação (r^2).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência alélica e genotípica dos genes investigados foi determinada por contagem direta dos alelos. O teste exato de Fisher, no formato de Fisher-Freeman-Halton (Freeman e cols., 1951), foi usado para comparação da distribuição dos alelos e dos genótipos *CYP2C9* da população estudada nos diferentes subgrupos e para comparação com frequências já descritas em outras populações. Os intervalos de confiança (95%) para os percentuais de frequências foram calculados pela estimativa da probabilidade de parâmetros multinomiais. O teste Qui-quadrado de

Pearson (X^2) de aderência foi usado para comparar as frequências observadas e as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

O desequilíbrio de ligação entre os SNPs de *VKORC1* foi avaliado no programa VG2 (<http://pga.gs.washington.edu/VG2.html>) e GENE-POP (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2.html). Os haplótipos *VKORC1* foram inferidos com probabilidades $>0,98$ para todos os indivíduos pelo programa haplo-stats (http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm).

As doses requeridas de warfarina pelos diferentes grupos genotípicos foram analisadas utilizando-se o teste de ANOVA (one way analysis of variance) e o teste de Student-Newman-Keuls para comparações par a par.

O programa utilizado para a realização de todas as análises estatísticas está disponível como ferramenta web (faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html e <http://department.obg.cuhk.edu.hk>), e o nível de significância foi fixado em P menor ou igual 0,05.

Outros testes estatísticos específicos empregados neste trabalho estão descritos nos artigos mostrados no item de resultados e discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo constituíram três artigos que já foram publicados e serão apresentados individualmente em três partes, assim denominadas:

1. Farmacogenética da warfarina em pacientes brasileiros
2. Contribuição do INR na dose requerida de warfarina
3. Consórcio Internacional de Farmacogenética da Warfarina

4.1. FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA EM PACIENTES BRASILEIROS

O artigo principal, que compõe todos os dados analisados inicialmente nos 390 pacientes recrutados no ambulatório de coagulação do INCL, foi publicado em agosto de 2008, na revista da Sociedade Americana de Farmacologia e Terapêutica - *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, intitulado: “Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients”.

Este é o primeiro estudo a mostrar as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas do gene *VKORC1* em uma amostra da população brasileira (tabela 2 do artigo). Cada genótipo *VKORC1* (3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A) está fortemente associado ($P < 0,0001$) com a dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros (tabela 3S do artigo). A frequência alélica e genotípica de *CYP2C9* (tabela 1S do artigo) está consistente com o que observamos anteriormente em uma amostra de indivíduos saudáveis (Vianna-Jorge e cols.,

2004). A influência dos genótipos *CYP2C9* na redução da dose requerida de warfarina está de acordo com o que foi descrito para um pequeno grupo de pacientes brasileiros (Lima e cols., 2008). A combinação dos dois genótipos, *CYP2C9* e *VKORC1*, mostra que ambos influenciam na dose requerida de warfarina (figura 1 do artigo).

As doses de warfarina necessárias para manter o INR terapêutico, dos 390 pacientes, variaram entre 5 a 75 mg por semana. Conforme algoritmo desenvolvido para esta população, 51% da variação observada na dose requerida de warfarina são explicados por fatores genéticos (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticos (idade, peso, indicação do tratamento com warfarina, uso concomitante de amiodarona e sinvastatina). Essa percentagem está acima da média (31 – 57%) dos algoritmos desenvolvidos para outras populações (Gage e cols., 2004; Wadelius e cols., 2005; Sconce e cols., 2005; Lee e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Carlquist e cols., 2006; Obayashi e cols., 2006; Aquilante e cols., 2006; Momary e cols., 2007; Caldwell e cols., 2007; Zhu e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008).

Dentre as variáveis incluídas no algoritmo (tabela 4 do artigo), o genótipo 3673G>A de *VKORC1* é o que mais contribui na determinação da dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros ($R^2 = 23,8\%$), corroborando com algoritmos desenvolvidos anteriormente para populações asiáticas (Lee e cols., 2006) e para algumas (Wadelius e cols., 2005; Rieder e cols., 2005; Takahashi e cols., 2006; Aquilante e cols., 2006; Caldwell e cols., 2007; Schelleman e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008), mas não todas as populações européias, euro-americanas e afro-americanas (Sconce e cols., 2005; Carlquist e cols., 2006; Momary e cols., 2007). O SNP 3673G>A, ocorre na região promotora do gene *VKORC1* e altera a sequência consenso E-box, provocando a diminuição de expressão do mRNA (Yuan e cols., 2005 e Wang e cols., 2008). Além disso, o alelo 3673G>A, ocorre em

forte desequilíbrio de ligação com outros alelos *VKORC1* (5808T>G, 6853G>C e 9041G>A), que também foram mostrados neste trabalho influenciando na dose requerida de warfarina (tabela S3 do artigo). A adição dos diplótipos de *VKORC1* no algoritmo não aumentou o poder da modelagem desenvolvida, conforme observado anteriormente por outros grupos (Rieder e cols., 2005 e Gage e cols., 2008).

Outra variável genética analisada no estudo foram os genótipos *CYP2C9* (tabela S1 do artigo), que contribuem com 6,9% da variação na dose requerida de warfarina. Esse valor encontra-se dentro da média (2,5 e 18,3%) quando comparado com outras populações (Sconce e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Rieder e cols., 2005; Carlquist e cols., 2006; Obayashi e cols., 2006; Aquilante e cols., 2006; Schelleman e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008). Entretanto, a influência dos alelos variantes de *CYP2C9* na dose requerida de warfarina pode ser nula como observado em malaios, ou de até 29% como descrito anteriormente nos indianos (Lee e cols., 2006). A enzima *CYP2C9* é responsável pelo metabolismo *in vivo* de S-warfarina (Gage e cols., 2008), que é o isômero que apresenta o maior efeito anticoagulante (Takahashi e cols., 2001). Os SNPs *CYP2C9**2, *3, *5 ou *11 analisados neste estudo, provocam redução significativa na 7'-hidroxilação de S-warfarina (Takanashi e cols., 2000; Lee e cols., 2002; Dickmann e cols., 2001; Tai e cols., 2005; Kirchheiner e cols., 2005; Yin e cols., 2006; Gage, 2006), refletindo na diminuição significativa da dose requerida para atingir o efeito anticoagulante desejado (Hill e cols., 2008; Becquemont, 2008; Stehle e cols., 2008; D'Andrea e cols., 2008; Kim e cols., 2009; Lindh e cols., 2009).

Além de polimorfismos genéticos, foram inseridas variáveis clínicas e fatores demográficos no algoritmo desenvolvido para pacientes brasileiros, corroborando com estudos

anteriores que também inserem variáveis não genéticas, tais como idade (Gage e cols., 2004; Sconce e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Lee e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Momary e cols., 2007; Caldwell e cols., 2007; Michaud e cols., 2008; Gage e cols., 2008), peso (Aquilante e cols., 2006; Carlquist e cols., 2006), presença de válvula cardíaca (Wadelius e cols., 2005; Obayashi e cols., 2006; Caldwell e cols., 2007), doença tromboembólica (Obayashi e cols., 2006; Gage e cols., 2008), e uso concomitante de amiodarona (Gage e cols., 2004; Wadelius e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Obayashi e cols., 2006; Gage e cols., 2008), e/ou sinvastatina (Gage e cols., 2004; Wadelius e cols., 2005). Entretanto, a cor da pele ou etnia, conforme relatado por Gage e colaboradores (2008), não contribuiu de forma significativa na dose requerida de warfarina em pacientes brasileiros. Apesar de existir diferença entre as médias de doses dos pacientes autodeclarados como brancos e pretos, a influência dos genótipos *CYP2C9* e *VKORC1* (tabela 3 do artigo) na dose de warfarina, ocorre independentemente da cor da pele por autodefinição. Além disso, a correlação entre cor da pele e a ancestralidade genética em brasileiros é incerta devido à extensa miscigenação oriunda de populações fundadoras ameríndias, européias e africanas (Suarez-Kurtz e cols., 2006 e Suarez-Kurtz e cols., 2007). Estudos em brasileiros, baseados em alelos específicos de populações e na distribuição de polimorfismos em genes de interesse farmacológico (*ABCB1*, *CYP3A5*, *GNB3* e *GSTM1*) enfatizam que existe um risco em igualar os conceitos de cor da pele por autodefinição com etnia e ancestralidade geográfica (Suarez-Kurtz e cols., 2007; Suarez-Kurtz e cols., 2007; Estrela e cols., 2008; Vargens e cols., 2008).

A presença de polimorfismos em outros genes (*APOE*, *GGCX*, *CYP4F2*, fator *VII* e *X*) pode influenciar na dose requerida de warfarina (Wadelius e cols., 2007). A vitamina K proveniente da dieta é absorvida no intestino e levada para o fígado por uma partícula lipídica que engloba a apolipoproteína E (Berkner e cols., 2004). Depois de reduzida, a vitamina K

atua como um cofator para que a enzima *GGCX* faça a carboxilação dos fatores de coagulação (II, VII, IX e X), dependentes de vitamina K (Buitenhuis e cols., 1990). O metabolismo da vitamina K1 ocorre via *CYP4F2*. O aumento das concentrações de VK1 e consequentemente a necessidade de doses maiores de warfarina, é resultado de polimorfismos no gene que codifica a enzima *CYP4F2* (McDonald e cols., 2009). Entretanto, estes genes (*APOE*, *GGCX*, *CYP4F2*, fator VII e X), que codificam enzimas envolvidas no ciclo da vitamina K não foram investigados neste estudo, porque já foi demonstrado que a sua contribuição na dose requerida do anticoagulante warfarina é mínima (aproximadamente 1%) ou até mesmo nula (Shikata e cols., 2004; Aquilante e cols., 2006; Sconce e cols., 2006; Wadelius e cols., 2007; Caldwell e cols., 2008; Cooper e cols., 2008; Kim e cols., 2009; Takeuchi e cols., 2009 e Fuchshuber-Moraes e cols., 2009).

Este estudo foi realizado durante as consultas de rotina do Sistema Único de Saúde - SUS do INCL, e reflete o cotidiano e a realidade da terapia anticoagulante com warfarina em brasileiros. As associações observadas neste estudo poderão ser utilizadas como um substrato inicial para reaplicação em um estudo prospectivo, visando avaliar os benefícios da individualização da terapêutica, baseado em fatores genéticos e não genéticos, a fim de evitar os efeitos colaterais provocados pela warfarina, além da rápida adesão do paciente ao tratamento anticoagulante, bem como os custos atrelados à implantação da farmacogenética.

Apesar das dificuldades, nós conseguimos mostrar que a modelagem farmacogenética, em prever a dose requerida de warfarina, pode ser aplicada em hospitais públicos brasileiros, já que as variáveis clínicas e demográficas utilizadas no algoritmo são obtidas facilmente no prontuário do paciente. Além disso, as genotipagens de *CYP2C9* e *VKORC1* podem ser realizadas a tempo do início da terapia anticoagulante.

Os dados obtidos neste trabalho, além de inéditos em brasileiros, terão um impacto importante em estudos de farmacogenética na nossa população. Modelos desenvolvidos para populações homogêneas, como as européias e americanas, não são aplicáveis às populações com alto grau de miscigenação, como é o caso do Brasil (Suarez-Kurtz, 2005; Suarez-Kurtz e cols., 2007; Suarez-Kurtz, 2008). Além disso, a warfarina é um dos poucos exemplos de aplicabilidade da farmacogenética com relevância clínica (Ingelman-Sundberg, 2008; Kim e cols., 2009).

Pharmacogenetics of warfarin: Development of a dosing algorithm for Brazilian patients

Jamila A. Perini¹, Claudio J. Struchiner², Edimilson Silva-Assunção³, Iris S. C. Santana¹, Flávio Rangel³, Elida B. Ojopi⁴ Emmanuel Dias-Neto⁴ and Guilherme Suarez-Kurtz¹

From ¹Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, ²Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, ³Ambulatório de Anticoagulação, Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras, Rio de Janeiro and ⁴Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Short title: Warfarin dosing algorithm for Brazilians

Correspondence to Dr. Guilherme Suarez-Kurtz, Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro 21230-050, Brazil.

Tel: +55 21 3233-1310 Fax: +55 21 3233-1340 email: kurtz@inca.gov.br

Word count: Abstract: 150 Introduction: 300 manuscript: 3891

Number of references: 38 figures: 4 tables: 4

Supplementary Information: 3 Supplementary tables

Key words: warfarin dosing algorithm, CYP2C9, VKORC1, Brazil, population admixture

Abstract

A dosing algorithm including genetic (*VKORC1* and *CYP2C9* genotypes) and non-genetic factors (age, weight, therapeutic indication and co-treatment with amiodarone or simvastatin) explained 51% of the variance in stable warfarin weekly dose in 390 patients attending an anticoagulant clinic in a Brazilian public hospital. The *VKORC1* 3673G>A genotype was the most important predictor of warfarin dose, with a partial R^2 value of 23.8%. Replacing the *VKORC1* 3673G>A genotype with *VKORC1* diplotype did not increase the algorithm's predictive power. We suggest that 3 other SNPs (5808T>G, 6853G>C and 9041G>A) that are in strong LD with 3673G>A would be equally good predictors of the warfarin dose requirement. The algorithm's predictive power was similar across the self-identified "race/color" subsets. "Race/color" was not associated with stable warfarin dose in the multiple regression model, although the required warfarin dose was significantly lower ($P=0.006$) in White (29 ± 13 mg/week, $n=196$) than in Black patients (35 ± 15 mg/week, $n=76$).

Warfarin is the most commonly used oral anticoagulant in the world. The maintenance dose of warfarin is usually determined by monitoring prothrombin time using an international normalized ratio (INR). Management of warfarin therapy requires frequent INR monitoring because of its narrow therapeutic index and large inter- and intra-individual variability. Incorrect dosage, especially during the initial phase of treatment, carries a high risk of bleeding or failure to prevent thromboembolism.¹ Polymorphisms in two genes, namely *CYP2C9* and *VKORC1* have been repeatedly found to associate with the clinical response to warfarin.²⁻¹³ *CYP2C9* encodes the cytochrome P-450 (CYP) enzyme, CYP2C9, which is primarily responsible for the disposition of S-warfarin, the most active isomer of clinically used racemic warfarin.¹⁴ *VKORC1* codifies the vitamin K epoxide reductase subunit I (VKORC1), a key enzyme of the vitamin K cycle and the molecular target of coumarin anticoagulants.^{15,16} *CYP2C9* and/or *VKORC1* genotypes have been included as covariates in several algorithms developed for the estimation of individual warfarin dosing requirements.^{2-7,10-12} As the frequency distribution of polymorphisms in these two genes varies across populations (<http://pgeni.unc.edu/purpose.asp>, <http://www.pharmgkb.org/views/project.jsp?pId=56>) the relative contribution of the *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes to estimates of warfarin dosing is not constant worldwide. For example, the *VKORC1* genotype was reported as not useful or of limited value for predicting warfarin dose requirements in African Americans,^{6,10} while explaining 18 and 37% of the variance in warfarin dose among Chinese and Malay, respectively.⁴ Here we report a study of the impact of *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms, as well as non-genetic covariates, in predicting the stable warfarin therapeutic dose in Brazilian Brazilian patients under chronic treatment with this anticoagulant for prevention of thromboembolism. Because of the heterogeneity and extensive admixture of the present-day Brazilian population, extrapolation

of data derived from well-defined ethnic groups is clearly not applicable to the majority of Brazilians.¹⁷⁻¹⁹

RESULTS

Table 1 summarizes the demographics and clinical characteristics of the 390 study subjects. The stable warfarin dose varied over a 15-fold range (5–75 mg/week) in the overall study population, with mean (SD) values of 28.9 (12.3), 32.9 (12.4) and 35.3 (14.6) in the White, Intermediate and Black groups, respectively ($P=0.0004$). Pair-wise comparison revealed that the warfarin weekly dose was significantly lower in White than in either Intermediate ($P=0.006$) or Black ($P=0.0003$) patients. There was no difference in the warfarin weekly dose between Intermediate and Black patients ($P=0.22$).

Allele frequency and genotype distribution

The *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium in the overall study population and in each group (White, Intermediate and Black). The overall frequency of *CYP2C9**2 and *3 alleles (11.8% and 5.4%, respectively; **Supplementary Table 1**) was consistent with our previous data for healthy Brazilians.²⁰ Alleles *CYP2C9**5 and *11 were detected with frequencies of 0.24% and 0.14%, respectively, whereas *CYP2C9**4 was not detected in the study cohort.

Table 2 shows the frequency distribution of the *VKORC1* polymorphisms. Significant differences in allele and genotype frequency were observed across the three “race/color” groups with respect to the 3673G>A ($P=0.003$ and $P=0.004$, respectively) and 5808T>G ($P=0.0001$ and $P=0.0007$, respectively) SNPs. In both cases, there was a trend for decreasing frequency of the variant alleles (3673A and 5808G) from White, to Intermediate and to Black

patients. By contrast, no significant differences were detected in allele or genotype distribution of the 6853G>C and 9041G>A SNPs across the three groups.

Linkage disequilibrium and haplotype distribution

The *VKORC1* 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C and 9041G>A SNPs were in strong linkage disequilibrium (LD) in the overall population and in each group, except for the 5808T>G and 9041G>A pair within the Black group (**Supplementary Table 2**). Five haplotypes, namely GTGA, AGCG, GTGG, ATCG and GTCG accounted for >99.5% of the diversity in each group (**Table 2**), but their distribution differed significantly across the three groups ($P=0.0002$, χ^2 test). Pair-wise comparisons revealed significant differences in haplotype frequency between Black and either White ($P<0.0001$) or Intermediate ($P=0.02$) patients, but no difference between Intermediate and White individuals.

Impact of *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms on stable warfarin dose

CYP2C9 genotype associated with the warfarin weekly dose ($P<0.0001$), consistent with a recent report for a smaller Brazilian cohort.²¹ The weekly dose was significantly higher in *CYP2C9**1/*1 patients (32.5±13.0 mg/week, n=268) than in patients with the *CYP2C9* genotypes *1/*2 (25.0±9.9, n=72, $P=10^{-7}$), *1/*3 (27.5±12.2, n=33, $P=0.005$), *2/*2 (22.5±7.2, n=7, $P=0.001$) and *2/*3 (17.5±4.7, n=5, $P=0.004$). The small numbers of individuals with genotypes *CYP2C9**1/*5 (32.5±14.1, n=2), *2/*11 (11.3, n=1), and *3/3 (18.8±8.8, n=2) precluded statistical analysis of their impact on the warfarin weekly dose. Analysis of the data according to the number of variant *CYP2C9* alleles indicated significant decreases in the weekly dose requirement with the increase in variant allele number in each self-identified race/color group (**Table 3**). Each of the genotyped *VKORC1* polymorphisms

associated strongly ($P < 0.0001$) with the warfarin weekly dose in the study cohort, and genotype effects were observed (Supplementary Table 3). Thus, the warfarin weekly dose increased from wild-type homozygous to heterozygous and to homozygous mutant patients with respect to the 9041G>A genotype but, conversely, decreased with respect to the 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C genotypes. We investigated whether self-reported race/color influenced the association between *VKORC1* 3673G>A genotype and warfarin dose requirement, and observed that in each “race/color” group, the required weekly dose decreased from the 3673GG to the GA and the AA genotype (Table 3). It is noteworthy that despite the significant association of warfarin weekly dose with *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes, there was substantial overlap of the individual doses among the different *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes in the overall study cohort. (not shown).

We next analyzed the combined influence of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes on the warfarin weekly dose. The *CYP2C9* genotypes were grouped according to the number of variant alleles (*2, *3, *5 and *11) present. We selected the *VKORC1* 3673G>A SNP for this analysis, in view of previous evidence that *VKORC1* haplotypes were reported to be no more informative than a single SNP chosen among those which we genotyped³ and that none of the SNPs in LD with 3673G>A is an independent predictor of warfarin dose, once 3673G>A genotype is included in multi-step regression models of warfarin dosing.¹¹ Analysis of the combined effect of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes (Figure 1) disclosed two distinct trends: first, among individuals with a given *CYP2C9* genotype, the warfarin weekly dose requirement declined from the 3673GG to the GA and to the AA genotype. Second, within each *VKORC1* 3673G>A genotype, the warfarin dose decreased as the number of variant *CYP2C9* alleles increases. Again, we point out that despite these trends, there was substantial overlap in the warfarin dose requirement across the combined genotype groups (Figure 1).

Warfarin dosing algorithm

The initial univariate analysis disclosed the following variables as being associated ($P < 0.15$) with warfarin weekly dose: *CYP2C9* genotype ($P < 0.001$), *VKORC1* 3673G>A genotype ($P < 0.001$), gender ($P < 0.14$), age ($P < 0.001$), race ($P < 0.001$), weight ($P < 0.01$), treatment indication ($P < 0.001$), systemic arterial hypertension ($P < 0.06$) and the concomitant use of one of the following drugs: simvastatin ($P < 0.10$), losartan or candesartan ($P < 0.02$), amiodarone ($P < 0.001$) and isosorbide ($P < 0.01$). These variables entered a multiple regression model and those that associated ($P < 0.07$) with the square root of the stable warfarin weekly dose are listed in Table 4 with their respective regression coefficients and their contribution to the model, as measured by the partial R^2 statistics. Based on the coefficient estimates in Table 4, the proposed regression equation for predicting the stable warfarin weekly dose in this patient cohort is: square root of weekly dose (mg) = $5.5104 - 0.0103 \times (\text{age in years}) + 0.0159 \times (\text{weight in Kg}) + 0.4284 \times (1, \text{ if having heart valve prosthesis, else } 0) + 0.3983 \times (1, \text{ if having thromboembolic disease, else } 0) - 0.4387 \times (1, \text{ if prescribed simvastatin, else } 0) - 0.7903 \times (1, \text{ if prescribed amiodarone, else } 0) - 0.6179 \times (1, \text{ if one } CYP2C9 \text{ variant allele, else } 0) - 1.0726 \times (1, \text{ if two } CYP2C9 \text{ variant alleles, else } 0) - 0.8516 \times (1, \text{ if } VKORC1 \text{ 3673GA genotype, else } 0) - 1.7856 \times (1, \text{ if } VKORC1 \text{ 3673AA genotype, else } 0)$. This regression model explains 50.4% of the overall variability in warfarin weekly dose in the study cohort (Figure 2). If one outlier (difference in observed vs. predicted dose > 30 mg/week, arrow in Figure 2) is excluded, the algorithm predictive power increases to 52.3. The mean values of the bias (MD%, Methods), precision (MAD%) and absolute difference in predicted vs. observed dose (AD) in the overall patient cohort are 2.9%, 23.5% and 6.9 mg/week. Figure 3 shows the distribution of the AD values in this cohort: in 79.5%

of the patients, the AD was ≤ 7 mg/week. In Figure 4 we present summary effects of predictors in the model using the covariate inter-quartile range (Methods).

In contrast to a recent study in North Americans,¹¹ our model predicted equally well the warfarin dose requirement in White (correlation coefficient between predicted and observed dose $r^2=0.51$, $n=196$) and in Black Brazilians ($r^2=0.53$, $n=76$). Finally, we investigated the consequence of replacing the *VKORC1* 3673G>A genotype with *VKORC1* diplotype in the multiple regression analysis, and observed no difference in the predictive power of the dosing algorithms.

Application of previously published dosing algorithms to the study cohort

We used our patient cohort data to assess the predictive power of previously published algorithms in Brazilian patients. Algorithms that include “race” as a covariate were not tested because of the inherent difficulty of extrapolating race/ethnic categorization to the heterogeneous Brazilian population (Introduction). Compared to ours, algorithms derived from white Europeans and North Americans, African-Americans and Japanese^{5,22,23} performed poorly when applied to our study cohort, with correlation coefficient (r^2), mean bias (MD%) and mean absolute difference in predicted vs. observed dose (AD) values of 0.36, 8.4% and 8.5 mg/week,²² 0.36, 22.1% and 9.2 mg/week⁵ and 0.39, 32.5% and 10.4 mg/week.²³ The corresponding values for our algorithm are 0.51, 2.9%, and 6.9 mg/week.

DISCUSSION

This retrospective study of 390 patients attending an anticoagulant clinic in a Brazilian public hospital confirms the extensive inter-individual variability of warfarin dose required to maintain the INR in the target range for prevention of thromboembolism. We used a multi-

step regression approach to developed a dosing algorithm, including both genetic (*VKORC1* and *CYP2C9* genotypes) and non-genetic factors (age, weight, therapeutic indication for warfarin therapy and concomitant administration of amiodarone or simvastatin), that explained 51% of the total variance of the stable warfarin weekly dose. This percentage is in the upper range of values (31-57%) reported for other dosing algorithms in various patient populations.^{2,4,5,7,10,11,23-28} The *VKORC1* 3673G>A genotype proved to be the most important predictor in our model, with a partial R² value of 23.8% in the multivariate dosing algorithm. The 3673G>A SNP, located in the promoter region of *VKORC1*, affects a transcription factor binding site,²⁹ and haplotypes comprising the A allele lead to reduced *VKORC1* expression in human liver.³ Replacing the *VKORC1* 3673G>A genotype with the inferred *VKORC1* diplotype for the 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C and 9041G>A SNPs did not improve the predictive power of the dosing algorithm, which is consistent with previous observations.^{3,11} Since the *VKORC1* 3673G>A SNP was in extensive LD with the 5808T>G, 6853G>C and 9041G>A SNPs, we suggest that any of these SNPs in could be used as predictors of the warfarin dose requirement in the study cohort. A predominant contribution of *VKORC1* polymorphisms to the variance in warfarin dosing has been reported for Chinese and Malay⁴ and in many,^{2,3,5-7,11,25,27} but not all^{22,24} studies in white Europeans and North Americans. Conflicting results were reported for the impact of *VKORC1* polymorphisms on the warfarin dose requirement in African Americans: one study reported no impact of the *VKORC1* 6853G>C polymorphism¹⁰ whereas in another study⁶ African Americans with the *VKORC1* 1173CC genotype (not investigated in the present study) required higher weekly maintenance dose than subjects with either the CT or TT genotype. The latter observation is consistent with our data in Black Brazilians for the *VKORC1* 3673G>A, which is in LD with *VKORC1* 1173C>T.⁶ Thus, the required warfarin dose in our Black patients with the *VKORC1* 3673GG

genotype was significantly higher than in those with the *VKORC1* 3673GA or AA genotype (Table 3). Because the same trend was observed in the White and Intermediate groups, we conclude that *VKORC1* 3673G>A genotype-specific differences in warfarin dose requirements exist independent of self-reported race/color in this Brazilian cohort. This conclusion may be extended to the *CYP2C9* genotype-specific differences, since the warfarin dose requirement decreased significantly with the increase in the number of variant *CYP2C9* alleles in self-reported White, Intermediate and Black patients (Table 3).

CYP2C9 genotype, the other pharmacogenetic variable examined in the present study, had a partial R² value of 6.9% in our multivariate dosing algorithm. Previously reported contributions of *CYP2C9* polymorphism to the total variance of the warfarin weekly dose disclose large inter- and intra-ethnic differences. A Singapore study provides one extreme example of inter-ethnic difference, with *CYP2C9* genotype explaining 29%, 7% and 0% of warfarin dosing variance in Indians, Chinese and Malay, respectively.⁴ Intra-ethnic variability may be exemplified by the seven-fold (2.5% - 18.3%) range in the reported contribution of *CYP2C9* genotype to the variance of warfarin dose requirement among white Europeans and North Americans.^{2,3,6,7,11,22,24-26}

Our dosing algorithm includes non-genetic covariates that have been previously reported as predictors of warfarin dose, such as age,^{2,4,5,7,10,11,22,25,27,28} weight,^{24,25} heart valve prosthesis,^{2,26,27} thromboembolic disease^{11,26} and co-treatment with amiodarone^{2,11,25,26,28} and simvastatin.^{2,28} However, self-reported race/color was not a significant predictor of warfarin requirements in our patient cohort, despite the significant differences in the maintenance warfarin dose across the race/color groups. This contrasts with a recently published warfarin dosing algorithm derived from a large cohort of US patients which includes “African American race” as a significant covariate.¹¹ This discordance may be related to a number of

factors including (i) our observation that *VKORC1* and *CYP2C9* genotype differences in warfarin dose requirements exist independent of self-reported race/color among Brazilians (see above); (ii) the greater proportion of European genetic ancestry among black Brazilians compared to African Americans, and (iii) the poor correlation of self-reported race/color with genetic ancestry among Brazilians.^{18,19} Indeed, we have recently shown that the distribution of polymorphisms in various genes of pharmacological relevance, such as *ABCB1*, *CYP3A5*, *GNB3* and *GSTM1s*, among the population of Rio de Janeiro, is best fit by a continuous function of the proportion of individual African ancestry, irrespective of self-reported race/color categories.³⁰⁻³²

In addition to providing the first report of the distribution of *VKORC1* polymorphisms in the heterogeneous Brazilian population, our study has distinct strengths: First, we had access to complete information on all drugs being dispensed rather than prescribed, since the participants were provided with their medication at the study site. Second, this study reflects real-life community prescribing and dispensing of warfarin in the context of a public hospital in a developing country. Third, the recruitment of patients from a notoriously admixed and heterogeneous population³⁰ provided supporting evidence to the notion that in such populations, self-reported race/color categorization is not a reliable predictor of drug dosing (or drug choice) in the context of pharmacogenetics-informed clinical practice.^{33,34} Fourth, the non-genetic covariates of our dosing algorithm are readily available in the patient medical record, whereas the genetic covariates, namely *CYP2C9* and *VKORC1* 3673G>A genotypes can be determined in a time frame compatible with the urgency of starting warfarin administration to many patients. We also recognize that this study has limitations, most of which are encountered in previous studies with a similar design: first, by being retrospective, the associations and dosing algorithm described in our study must be prospectively tested in a

appropriately large cohort. Second, we did not address the impact of the algorithm dosing on the clinical response to warfarin, but instead used the INR as a surrogate for it. Third, by explaining about 50% of the variance in warfarin dosing, our algorithm leaves one-half of this variance to be accounted for by other variables, such as polymorphisms in factor VII and factor X genes²⁵, *APOE*³⁵ and *CYP4F2*³⁶ or yet unknown. Finally, our dosing algorithm, developed for a heterogeneous and admixed population of a large Brazilian city, may not be applicable to other population groups.

METHODS

Study population

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras, a reference cardiology hospital of the Brazilian public health system, located in Rio de Janeiro. All participating patients (n=390) provided written informed consent. The clinical indications for warfarin anticoagulation therapy are listed in **Table 1**. In each patient, the orally administered dose of warfarin was adjusted by the attending physician, based on the INR values measured at the institution clinical laboratory. Complete warfarin dosing information was obtained from the individual medical records and used to calculate the stable warfarin dose, defined as the prescribed weekly dose associated with the first three consecutive INR readings within target range. The INR target range was 2-3 for all patients, except those with heart valve prosthesis, whose INR target range was 2.5-3.5. The subjects answered a questionnaire about their ancestry and demographics, and self-identified according to the classification scheme used in the last Brazilian Census (<http://censos2007.ibge.gov.br>), which relies on self-perception of skin color. Accordingly, the

individuals were distributed in three “race/color” groups: “Branco” (White, n=196), “Pardo” (meaning Brown, here denoted as Intermediate, n=118) and “Preto” (Black, n=76).

***CYP2C9* and *VKORC1* genotyping, linkage disequilibrium and haplotype analyses**

DNA was extracted from blood samples using the GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer’s instructions. *CYP2C9* variant alleles were genotyped by PCR-RFLP (allele *2)²⁰ or by direct sequencing (alleles *3, *4, *5 and *11),³⁷ using the BigDye® Terminator v3.1 sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Custom TaqMan® SNP genotyping was developed to discriminate the *VKORC1* 3673G>A (rs9923231), 5808T>G (rs2884737), and 9041G>A (rs7294) alleles. Sequences of primers and probes used in this study are available from the authors by request. A validated TaqMan assay for detection of *VKORC1* 6853G>C (rs8050894) polymorphism was purchased from Applied Biosystems. Polymerase chain reaction amplification for all SNPs was performed in 10 µl reactions with 9 ng of template DNA, 1x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1x each primer and probe assay, and H₂O q.s.p. Thermal cycling initiated with a first denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The allele detection process was performed for 1 min at 60°C on a Fast 7500 Real-Time System (Applied Biosystems) to determine the allelic discrimination.

CYP2C9 and *VKORC1* allele frequency and genotype distribution were derived by gene counting. LD analyses of *VKORC1* polymorphisms were performed online using the VG2 (<http://pga.gs.washington.edu/VG2.html>) and GENE-POP programs (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2.html). Pairwise LD between loci was assessed by

ID¹ and rho square (r^2). The *VKORC1* haplotypes were statistically inferred by the haplo-stats software, version 1.3,³⁸ available at http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm. This software attributes a posterior probability value for the diplotype configuration for each individual, based on estimated haplotype frequencies. Diplotypes were inferred with probabilities > 0.98, for all individuals.

Multivariate regression model

To select candidate variables for the multiple regression model of warfarin dosing, we initially examined the independent effects of demographic (age, gender, “race/color” and weight), clinical (treatment indication, concomitant disease states, concomitant drug use and smoking status) and genetic (*VKORC1* 3673G>A genotype and number of variant *CYP2C9* alleles *2, *3, *5 and *11) variables individually. All discrete covariates entered the analysis transformed as dummy variables to quantify how the individual categories affected warfarin weekly dose. Variables that were associated ($P < 0.15$) with warfarin dose in the initial analyses were considered further in a multivariate regression model. Motivated by the need to stabilize the variance and to remove residual patterns identified through the use of diagnostic plots we tested several transformation functions of the response variable and settled for the square root of weekly dose as the most appropriate. The square root transformation helped to stabilize the variance and remove residual patterns identified in the diagnostic plots.. Variables that associated ($P < 0.07$) with the square root of the warfarin weekly dose were then included in a dosing algorithm. The bias of the dosing algorithm estimates was assessed by calculating the mean percentage of difference (MD %) from the observed dose, where $MD \% = [(predicted\ dose - observed\ dose)/observed\ dose] \times 100\%$, and precision was assessed by calculating the

mean absolute percentage of difference (MAD %), where $MAD \% = (|predicted\ dose - observed\ dose| / observed\ dose) \times 100\%$. We also calculated the absolute difference between predicted and observed dose (AD), where $AD\ (mg/week) = |predicted\ dose - observed\ dose|$. Finally, the summary effect size of each predictor covariate on the square root of weekly dose of warfarin was computed as the difference between the predicted values of the response variable, dose, calculated at the lower and upper quartile while maintaining the remaining covariates at their median values, if continuous, or at their baseline category value, if discrete. The effects of discrete variables are described by electing a baseline category and comparing the transformed response predicted at this category with the remaining categories of interest.

Statistical analyses

Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were assessed by the goodness-of-fit χ^2 test. Allele and genotype frequencies were compared using the χ^2 test, or when appropriate, the Fisher exact test. Differences in warfarin weekly dose were assessed using ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test. All these test were performed online (faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html and <http://department.obg.cuhk.edu.hk>) and a P value <0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Swiss Bridge Foundation and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). EBO

and EDN acknowledge the support of Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog Silva (ABADHS) to the Laboratório de Neurociências, FM-USP.

Supplementary information available at <http://www.nature.com/cpt>

REFERENCES

1. Levine, M.N., Raskob, G., Landefeld, S. & Kearon, C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest*. **119**, 108S-121S (2001).
2. Wadelius, M. *et al.* Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* **5**, 262-270 (2005).
3. Rieder, M.J. *et al.* Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2285-2293 (2005).
4. Lee, S.C. *et al.* Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population. *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**, 197-205 (2006).
5. Takahashi, H. *et al.* 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**, 101-10 (2006).
6. Schelleman, H. *et al.* Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 742-747 (2007).

7. Michaud, V. *et al.* Combination of Phenotype Assessments and CYP2C9-VKORC1 Polymorphisms in the Determination of Warfarin Dose Requirements in Heavily Medicated Patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 740-748 (2007).
8. Oldenburg, J., Bevans, C.G., Fregin, A., Geisen, C., Müller-Reible, C. & Watzka, M. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb. Haemost.* **98**, 570-578 (2007).
9. Yin, T. & Miyata, T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb. Res.* **120**, 1-10 (2007).
10. Momary, K.M., Shapiro, N.L., Viana, M.A., Nutescu, E.A., Helgason, C.M. & Cavallari, L.H. Factors influencing warfarin dose requirements in African-Americans. *Pharmacogenomics* **8**, 1535-1544 (2007).
11. Gage, B.F. *et al.* Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to Predict the Therapeutic Dose of Warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.* Epub ahead of print (2008).
12. Limdi, N.A. *et al.* Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 312-321 (2008).
13. Schwarz, U.I. *et al.* Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N. Engl. J. Med.* **358**, 999-1008 (2008).
14. Kaminsky, L.S. & Zhang, Z.Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol. Ther.* **73**, 67-74 (1997).
15. Li, T., Chang, C.Y., Jin, D.Y., Lin, P.J., Khvorova, A. & Stafford, D.W. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **427**, 541-544 (2004).

16. Rost, S. *et al.* Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* **427**, 537-541 (2004).
17. Suarez-Kurtz, G. Pharmacogenetics in admixed populations. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**,196-201 (2005).
18. Suarez-Kurtz, G. & Pena, S.D.J. Pharmacogenomics in the Americas: Impact of genetic admixture. *Curr. Drug Targets* **7**, 1649-1658 (2006).
19. Suarez-Kurtz, G. & Pena, S.D.J. Pharmacogenetics in the Brazilian population. In: *Pharmacogenomics in Admixed Populations*. Suarez-Kurtz G (Ed.), Landes Bioscience, Austin, USA, 75-98 (2007). Available at: <http://www.eurekah.com/chapter/3157>
20. Vianna-Jorge, R., Perini, J.A., Rondinelli, E. & Suarez-Kurtz, G. *CYP2C9* genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin. Pharmacol. Ther.* **76**, 18-26 (2004).
21. Lima, M.V., Ribeiro, G.S., Mesquita, E.T., Victor, P.R., Vianna-Jorge, R. *CYP2C9* genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **64**, 9-15 (2008).
22. Sconce, E.A. *et al.* The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* **106**, 2329-2333 (2005).
23. Zhu, Y. *et al.* Estimation of warfarin maintenance dose based on *VKORC1* (-1639G>A) and *CYP2C9* genotypes. *Clin. Chem.* **53**, 1199-1205 (2007).

24. Carlquist, J.F. *et al.* Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J. Thromb. Thrombolysis.* **22**, 191-197 (2006).
25. Aquilante, C.L. *et al.* Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**, 291-302 (2006).
26. Obayashi, K. *et al.* VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 169-178 (2006).
27. Caldwell, M.D. *et al.* Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin. Med. Res.* **5**, 8-16 (2007).
28. Gage, B.F., Eby, C., Milligan, P.E., Banet, G.A., Duncan, J.R. & McLeod, H.L. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb. Haemost.* **91**, 87-94 (2004).
29. Yuan, H.Y. *et al.* A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1745-1751 (2005).
30. Suarez-Kurtz, G., Vargens, D.D., Struchiner, C.J., Bastos-Rodrigues, L. & Pena, S.D.J. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of *GST* polymorphisms. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 765-771 (2007).
31. Suarez-Kurtz, G., Perini, J.A., Bastos-Rodrigues, L., Pena, S.D. & Struchiner, C. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. *Pharmacogenomics* **8**, 1299-1306 (2007).

32. Estrela, R.C. *et al.* Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics* **9**, 267-276 (2008).
33. Suarez-Kurtz, G. The implications of population admixture in race-based drug prescription. *Clin. Pharmacol Ther.* **83**, 399-400 (2008).
34. Suarez-Kurtz, G. Ethnic differences in drug therapy: A pharmacogenomics perspective. *Exp. Rev. Clin Pharmacol.* **1**, 337-339 (2008).
35. Sconce, E.A., Daly, A.K., Khan, T.I., Wynne, H.A. & Kamali, F. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. *Pharmacogenet. Genomics* **16**, 609-611 (2006).
36. Caldwell, M.D. *et al.* CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* **111**, 4106-4112 (2008)
37. Allabi, A.C., Gala, J.L., Desager, J.P., Heusterspreute, M. & Horsmans, Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 653-657 (2003).
38. Schaid, D.J., Rowland, C.M., Tines, D.E., Jacobson, R.M. & Poland, G.A. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 425-434 (2002).

Table 1 Demographics and clinical characteristics of the study cohort

Variable	Cohort n=390
Age (years)	54 (18 – 91) ^a
Weight (kg)	69.0 (34.0 – 117.5) ^a
Gender (male:female)	n (%)
Male	186 (48%)
Female	204 (52%)
Smoking status	
Current smokers	17 (4.4%)
Ex-smokers	155 (39.7%)
Never smoking	218 (55.9%)
“Race/ethnicity”	
White	196 (50.3%)
Intermediate	118 (30.2%)
Black	76 (19.5%)
Indication for warfarin therapy	
Heart valve prosthesis	156 (40.0%)
Atrial fibrillation	135 (34.6%)
Atrial fibrillation and heart valve prosthesis	70 (18.0%)
Thromboembolic disease	20 (5.1%)
Other	9 (2.3%)
Concomitant disease ^b (n = 296)	
Hypertension	245 (62.8%)
Rheumatic fever	100 (25.6%)
Diabetes	30 (7.7%)
Concomitant medications ^b (n=330)	
Furosemide	152 (39.0%)
Digoxin	120 (30.8%)
Captopril	118 (30.0%)
Beta blockers (atenolol, carvedilol, propranolol)	97 (24.9%)
Amiodarone	61 (15.6%)
Losartan / Candesartan	41 (10.5%)
Spironolactone	40 (10.3%)
Enalapril	40 (10.3%)
Penicillin G	34 (8.7%)
Simvastatin	31 (7.9%)
Isosorbide	23 (5.9%)
Aspirin	22 (5.6%)
Hydrochlorothiazide	22 (5.6%)
Calcium antagonists (diltiazem, verapamil)	20 (5.1%)

^a Median (range)

^b A patient can have more than one concomitant disease or medication.

Table 2 Allele, genotype and haplotype distribution of *VKORC1* polymorphisms

SNPs ^a		White (n=196)	Intermediate (n=118)	Black (n=76)	χ^2 test P value
3673G>A	GG	40 (33 – 47)	40 (32 – 50)	58 (46 – 69)	0.004
	GA	45 (38 – 53)	52 (42 – 61)	39 (28 – 51)	
	AA	15 (10 – 21)	8 (4 – 14)	3 (0.3 – 9)	
	G	62 (58 – 67)	67 (60 – 73)	78 (70 – 84)	0.003
	A	38 (33 – 43)	33 (27 – 40)	22 (16 – 30)	
5808T>G	TT	55 (48 – 62)	62 (53 – 71)	80 (70 – 89)	0.0007
	TG	37 (30 – 44)	35 (26 – 44)	20 (11 – 30)	
	GG	8 (4 – 12)	3 (0.5 – 7)	0	
	T	74 (69 – 78)	80 (74 – 85)	90 (84 – 94)	0.0001
	G	26 (22 – 31)	20 (15 – 26)	10 (6 – 16)	
6853G>C	GG	34 (27 – 41)	36 (27 – 45)	38 (27 – 50)	0.44
	GC	49 (42 – 56)	52 (43 – 62)	53 (41 – 64)	
	CC	17 (12 – 23)	12 (7 – 19)	9 (4 – 18)	
	G	58 (53 – 63)	62 (55 – 68)	64 (56 – 72)	0.35
	C	42 (37 – 47)	38 (32 – 45)	36 (28 – 44)	
9041G>A	GG	42 (35 – 49)	33 (25 – 42)	33 (23 – 45)	0.43
	GA	45 (38 – 53)	55 (46 – 64)	53 (41 – 64)	
	AA	13 (8 – 18)	12 (7 – 19)	14 (7 – 24)	
	G	65 (60 – 69)	61 (54 – 67)	59 (51 – 67)	0.42
	A	35 (31 – 40)	39 (33 – 46)	41 (33 – 49)	
Haplotypes ^b		White (n=392)	Intermediate (n=236)	Black (n=152)	χ^2 test P value
GTGA		139 (35.5)	92 (39.0)	62 (40.8)	0.0002
AGCG		103 (26.3)	47 (19.9)	15 (9.9)	
GTGG		89 (22.7)	53 (22.5)	36 (23.7)	
ATCG		44 (11.2)	31 (13.1)	19 (12.5)	
GTCG		17 (4.3)	11 (4.7)	20 (13.2)	

^a Data expressed as percent, mean (95% CI).

^b Data expressed as number (%), based on diplotype estimates.

Table 3 Distribution of the warfarin dose (mg/week) in the study groups

Group	n	<i>CYP2C9</i> variant alleles			<i>ANOVA</i>	<i>VKORC1</i> genotype			<i>ANOVA</i>
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>P</i> value	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>P</i> value
White	196	32.4±12.4	24.5±9.8	16.3±5.7	<.0001	34.7±13.5	27.3±9.6 ^c	18.5±6.8 ^{c,d}	<.0001
Intermediate	118	34.6±12.3	29.1±11.7	24.2±1.4	.05	37.8±11.6	31.5±11.2	16.8±5.4	<.0001
Black	76	37.4±14.5	28.0±11.4	11.3	.005	41.1±15.0	27.7±9.6	23.8±8.8	<.0001

Data expressed as mean ± SD

Table 4 Multiple linear regression model for prediction of weekly warfarin dose

Variable	Partial regression coefficient	<i>P</i> value	R ² for model (%)
Age (years)	- 0.0103	7.10 ⁻³	1.2
Weight (Kg)	0.0159	5.10 ⁻⁵	2.7
Heart valve prosthesis	0.4284	5.10 ⁻⁴	
Thromboembolic disease	0.3982	7.10 ⁻²	2.1
Simvastatin	- 0.4386	10 ⁻²	1.0
Amiodarone	- 0.7903	10 ⁻⁸	5.6
<i>CYP2C9</i> *2/*3/*5/*11			
One variant allele	- 0.6179	10 ⁻⁹	6.9
Two variant alleles	- 1.0726	10 ⁻⁶	
<i>VKORC1</i> 3673G>A			
3673GA	- 0.8516	<10 ⁻¹²	23.8
3673AA	- 1.7856	<10 ⁻¹²	

Figure Legends

Figure 1 Association of *CYP2C9* and *VKORC1* 3673G>A polymorphisms (abscissa) with warfarin weekly dose requirements (ordinate). *CYP2C9* genotype is labeled as wild-type (**1/*1*), one variant allele (**1/*2*, **1/*3* and **1/*5*) and two variant alleles (**2/*2*, **2/*3*, **2/*11* and **3/*3*). Within each *CYP2C9* genotype, the *VKORC1* genotype at 3673G>A is shown as GG, GA or AA.

Figure 2 Relationship between warfarin weekly doses predicted by the multiple regression model described in the text (abscissa) and the stable doses actually taken by the 390 patients (ordinate) in self-identified White (black triangles, n = 176), Intermediate (open circles, n = 118) and Black patients (black squares, n = 76). The identity line is traced.

Figure 3 Histogram of the distribution of the absolute values of the difference between model-predicted vs. observed warfarin weekly dose for the 390 patients of the study cohort.

Figure 4 Summary effects of predictors in the multistep regression model using the covariate interquartile range. To generate this figure we computed the square root of the warfarin weekly dose at the lower quartile of a covariate, holding all other covariates at their medians, then set the covariate of interest to its upper quartile and again compute the predicted warfarin weekly dose of. By plotting the difference between those two values of the predicted dose we obtain an estimate of the effect of the covariate of interest. The effect of discrete covariates is described similarly by comparing two categories of the covariate at the time. In addition to the point

estimates we also present the confidence intervals of the summary effect of the covariate at different levels.

4.2. CONTRIBUIÇÃO DO INR NA DOSE REQUERIDA DE WARFARINA

Em resposta ao artigo de Li e colaboradores (2008), nós publicamos uma carta ao editor em abril de 2009, na revista *Blood*, intitulada: “Relative contribution of *VKORC1*, *CYP2C9*, and INR response to warfarin stable dose”.

Recentemente, Li e colaboradores (2008), observaram que a contribuição do INR ($R^2 = 42\%$ e 32%), ao algoritmo desenvolvido para prever a dose estável de warfarina em 214 pacientes, é maior que a contribuição dos genótipos *CYP2C9* e *VKORC1* ($R^2 = 19\%$ e 27%). Mostrando que a estratégia farmacogenética para determinar a dose requerida de warfarina é ineficiente quando comparado aos modelos baseados em variáveis clínicas e fatores demográficos. Outro estudo envolvendo 132 pacientes hospitalizados também mostrou que em um dos algoritmos desenvolvidos para essa população, o INR explica 13% da variação na dose estável de warfarina, enquanto as variáveis genéticas (*CYP2C9* e *VKORC1*) são responsáveis por cerca de 7% dessa variação.

Entretanto, nós desenvolvemos um novo algoritmo (tabela 1 do artigo) que inclui a primeira medida de INR dividida pela dose de warfarina administrada, além de variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas (idade, peso, indicação do tratamento com warfarina, uso concomitante de amiodarona e sinvastatina) analisadas anteriormente na nossa modelagem (Perini e cols., 2008). E desta maneira, obtivemos um coeficiente de correlação ($R^2 = 60\%$) maior do que os descritos por Li e colaboradores, 2008 ($R^2 = 40\%$ e 46%), e Michaud e colaboradores, 2008 ($R^2 = 31\%$ e 51%).

Os genótipos de *VKORC1* continuam sendo os mais importantes na determinação da dose requerida de warfarina ($R^2 = 20,1\%$), corroborando com os nossos resultados em Perini e

colaboradores (2008). Enquanto que a variável INR contribuiu com cerca de 5% da variação na dose estável de warfarina. Assim, a modelagem farmacogenética para prever a dose requerida de warfarina é a melhor estratégia em pacientes brasileiros, já que juntos, polimorfismos *CYP2C9* e *VKORC1*, explicam 25,8% da variação na dose estável de warfarina.

Letter to the Editor

Relative contribution of *VKORC1*, *CYP2C9* and INR response to warfarin stable dose

G Suarez-Kurtz,¹ JA Perini,¹ E Silva-Assunção² and CJ Struchiner³

From ¹Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, ²Ambulatório de Anticoagulação, Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras, Rio de Janeiro and ³Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,

Short title: Warfarin dosing algorithm

Correspondence to Guilherme Suarez-Kurtz, MD, PhD, Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro 21230-050, Brazil.

Tel: +55 21 3233-1310 Fax: +55 21 3233-1340 email: kurtz@inca.gov.br

Word count: text 495

Number of references: 10

Table: 1

Li *et al.*¹ reported recently in *Blood* that much of the information provided by *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes during warfarin initiation therapy in outpatients is captured by early INR responses. This confirms and extends previous observations in hospitalized, heavily medicated patients, that dose-adjusted INR (INR/dose) at day 4 is the most important predictor of warfarin dose at day 14.² However, the predictive power of the best regression models in both studies, expressed by the correlation coefficient (r^2) between predicted and observed doses - 0.40¹ and 0.51² - is not superior to that of several pharmacogenetic dosing algorithms without an INR covariate, including the algorithm that we developed for Brazilian patients.³⁻⁸ We now report that adding INR/dose as a variable in multi-step regression modeling of the stable warfarin dose in the Brazilian cohort leads to a novel algorithm with greater predictive power. Details of the original study design and linear multiple regression modeling of the stable warfarin dose have been published.³ For the present model development, we used the first available INR/dose measurement from 260 patients randomly chosen among the 390 patients in our cohort; the remaining 130 patients were used for model validation. The most informative regression model retained the same covariates previously identified as associated with stable warfarin weekly dose in this cohort (age, weight, treatment indication, comedication with amiodarone or simvastatin, *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes) but included also an INR/dose term (Table 1A). The r^2 for the correlation between observed and model-predicted warfarin weekly dose in the development and the validation sets, was 0.60 and 0.59, respectively (Table 1B), compared to 0.51 for our previous algorithm, which did not include an INR term.³ The mean absolute difference between model-predicted and observed doses, 6.5 and 6.2 mg/week in the development and validations sets, respectively, did not differ from 6.9 mg/week for our previous algorithm.³

VKORC1 genotype remained the most important predictor of warfarin weekly dose in the novel algorithm (Table 1A). This contrasts with the predominant contribution of INR-associated terms, and the relatively small contribution of *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes in Li *et al.*¹ and Michaud *et al.*² Differences in population cohorts, clinical settings (e.g. expertise in INR-guided warfarin dose titration),¹ assessed outcomes and time of INR/dose measurements might account for this discrepancy. A distinct feature of our algorithm is that the individual INR/dose term does not represent a fixed time point after starting warfarin therapy, but rather the first measurement taken after admission of the patients in the anticoagulant unit. This feature is potentially useful

for patients under continuous warfarin treatment, who had not reached stable dosing despite repeated dose adjustments.

In summary, we confirmed that inclusion of an INR-related term increased (from 0.51 to 0.60) the predictive power of warfarin dosing pharmacogenetic algorithms for Brazilian outpatients under chronic warfarin therapy. However, INR measurements did not entirely capture the information provided by *CYP2C9* and, especially *VKORC1* genotypes, the latter remaining the most informative predictor of stable warfarin dose requirements in our cohort.

References

1. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Stein CM, Kurnik D. Relative contribution of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2008 prepublished online Dec 12, 2008 doi:10.1182/blood-2008-09-176859
2. Michaud V, Vanier MC, Brouillette D et al. Combination of phenotype assessments and *CYP2C9*-*VKORC1* polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:740-748.
3. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84:722-728.
4. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA et al. The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005;106:2329-2333.
5. Wadelius M, Chen LY, Downes K et al. Common *VKORC1* and *GGCX* polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J*. 2005;5:262-270.
6. Veenstra DL, You JH, Rieder MJ et al. Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (*VKORC1*) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:687-691.
7. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79:291-302.
8. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA et al. 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*. 2006;16:101-110.

9. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ et al. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res*. 2007;5:8-16.
10. Gage BF, Eby C, Johnson JA et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84:326-331.

Acknowledgement

Funding/support: Supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) and Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

Author contributions: G.S-K. designed the research, analyzed data, wrote the manuscript and obtained funding; J.A.P. contributed to data collection and analysis, and edited the manuscript; E.A-S. recruited and followed the patients, and contributed to data collection; C.J.S contributed to data analysis and edited the manuscript.

Financial disclosure: The authors declare no competing financial interests relevant to this Letter.

Table 1 Multiple linear regression model for prediction of weekly warfarin dose**A. Model development**

Variable	Partial regression coefficient	<i>P</i> value	Partial <i>R</i> ² statistics (%)
Age (years)	- 0.0054	1.10 ⁻¹	0.3
INR/dose (1 st available)	-2.9909	3.10 ⁻⁸	4.9
Weight (Kg)	0.0157	3.10 ⁻⁵	2.7
Heart valve prosthesis	0.5726	1.10 ⁻⁶	3.8
Thromboembolic disease	0.4333	3.10 ⁻²	
Simvastatin	- 0.4442	10 ⁻²	1.0
Amiodarone	- 0.7748	10 ⁻⁹	5.9
<i>CYP2C9</i> *2/*3/*5/*11			
One variant allele	- 0.5115	2.10 ⁻⁶	5.7
Two variant alleles	- 1.1043	10 ⁻⁵	
<i>VKORC1</i> 3673G>A			
3673GA	- 0.8352	5.10 ⁻⁷	20.1
3673AA	- 1.6841	<10 ⁻¹²	

B. Model performance*

Sample set (n)	Correlation coefficient [¶] (<i>r</i> ²)	Mean absolute difference [#] (mg/week)
Development set (260)	0.60	6.5
Validation set (130)	0.59	6.2

* Based on the following regression equation: Square root of warfarin weekly dose (mg/week) = 5.5691 - 0.0054 x (age in years) -2.9909 x (INR/ dose, mg/week) + 0.0157 x (weight in kg) + 0.5726 x (1, if patient has heart valve prosthesis, else 0) + 0.4333 x (1, if patient has thromboembolic disease, else 0) - 0.4442 x (1, if prescribed simvastatin, else 0) - 0.7748 (1, if prescribed amiodarone, else 0) - 0.5115 x (1, if patient has one *CYP2C9* variant allele, else 0) - 1.1043 x (1, if patient has two *CYP2C9* variant alleles, else 0) - 0.8352 x (1, if *VKORC1* 3673GA genotype, else 0) - 1.6841 x (1, if *VKORC1* 3673 AA genotype, else 0).[¶] Correlation coefficient (*r*²) between weekly warfarin dose predicted by the dosing algorithm (predicted dose) and the

dose actually taken (observed dose) by the patients. #MAE is the mean absolute difference between predicted and observed doses.

4.3. CONSÓRCIO INTERNACIONAL DE FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA

Dentre os 390 pacientes participantes dos estudos anteriores, 217 foram aleatoriamente selecionados e inseridos no trabalho realizado pelo Consórcio Internacional de Farmacogenética da Warfarina (IWPC), sendo publicado em fevereiro de 2009, na revista *New England Journal of Medicine*, intitulado: “Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data”.

O IWPC (www.pharmgkb.org) é constituído de 21 grupos de pesquisa, o que corresponde a um banco de dados de 5700 pacientes em terapia com warfarina, provenientes de nove países, englobando a totalidade de quatro continentes. Foram analisados, neste estudo, 5052 pacientes com dose estável e INR terapêutico entre 2 e 3 (tabela S2 do artigo), de diferentes origens étnicas (tabela 1 do artigo), sendo que os pacientes provenientes da América do Sul foram todos incluídos pelo nosso grupo, correspondendo a um total de 217 brasileiros (grupo número 17).

A dose requerida de warfarina para manter o INR terapêutico foi estimada e comparada entre três modelos diferentes (tabelas S1e e S1f do artigo): algoritmo farmacogenético, envolvendo variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas (idade, peso, altura, etnia, e medicamentos associados - carbamazepina, fenitoína, rifampicina ou amiodarona); algoritmo clínico envolvendo apenas as variáveis não genéticas; e um modelo de dose fixa (35 mg por semana). O algoritmo farmacogenético é o que melhor estima a dose semanal de warfarina ($R^2 = 47\%$), quando comparado com o algoritmo clínico ($R^2 = 27\%$) ou pelo método de dose fixa (tabela 2 do artigo). Além disso, a diferença absoluta entre a dose real de warfarina administrada nos pacientes e a dose prevista pelos três algoritmos analisados,

é significativamente menor no modelo farmacogenético (média do erro absoluto = $8,3 \pm 1,7$ mg/semana), quando comparado ao algoritmo clínico (média do erro absoluto = $10,0 \pm 2,0$ mg/semana) ou com o modelo de dose fixa (média do erro absoluto = $13,3 \pm 2,4$ mg/semana).

A eficiência do algoritmo farmacogenético em prever a dose requerida de warfarina é especialmente importante nos pacientes que requerem doses abaixo de 21 mg por semana ou acima de 49 mg por semana, que representam 46% dos 5052 pacientes (figura 2 e tabela 3 do artigo). Nesse grupo de pacientes que recebem doses extremas, estão os pacientes mais suscetíveis aos efeitos colaterais provocados pelos anticoagulantes orais, porque um paciente que recebe uma dose excessiva de warfarina está sujeito a apresentar uma hemorragia, podendo vir a óbito. No extremo oposto, pacientes que recebem doses de warfarina insuficientes para alcançar a janela terapêutica, podem estar sendo subtratados, e desta maneira, podem apresentar um quadro de trombose.

Considerando o algoritmo farmacogenético (tabela 7S do artigo), as variáveis mais importantes na determinação da dose requerida de warfarina são os genótipos de *CYP2C9* ($R^2 = 7,2\%$) e *VKORC1* ($R^2 = 13,3\%$), conforme relatado anteriormente por outros grupos (Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Millican e cols., 2007; Schelleman e cols., 2007). Já no algoritmo clínico, que apresenta uma menor estimativa da dose requerida de warfarina que o algoritmo farmacogenético (tabela 2 do artigo), as variáveis com maior poder preditivo são (tabela 7S do artigo): idade ($R^2 = 6,3\%$) e etnia ($R^2 = 4,4\%$). É importante ressaltar, que a extrapolação de um algoritmo que inclui a variável etnia para um grupo formado por pacientes brasileiros pode ser equivocada. Os atuais 190 milhões de brasileiros (IBGE, 2009) formam uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultante de mais de 500 anos de extensa miscigenação entre: ameríndios nativos, colonizadores europeus, africanos, originalmente

trazidos para o nosso país como escravos, além de uma pequena contribuição asiática mais recente. Essa complexa diversidade da população brasileira provoca uma considerável dificuldade em se obter uma classificação baseada na origem continental, étnica, racial ou na aparência física (Alves-Silva e cols., 2000 e Parra e cols., 2003; Suarez-Kurtz e cols., 2006 e Suarez-Kurtz e cols., 2007).

Devido à insuficiência de informação proveniente dos 21 grupos participantes, outros fatores genéticos (*CYP4F2*, *APOE* ou *GGCX*), clínicos e demográficos não foram incluídos no estudo. Entretanto, os 47% da variação na dose requerida de warfarina, que são explicados pelo modelo farmacogenético desenvolvido para os 5052 pacientes de diferentes países é similar à percentagem obtida por outros grupos (Sconce e cols., 2005; Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Aquilante e cols., 2006; Takahashi e cols., 2006; Tham e cols., 2006; Millican e cols., 2007; Momary e cols., 2007; Schelleman e cols., 2007; Caldwell e cols., 2007), mostrando que a influência de polimorfismos em outros genes é mínima.

5. CONCLUSÕES

5.1. FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA EM PACIENTES BRASILEIROS

- As frequências dos genótipos *CYP2C9* (incluindo os alelos *2, *3, *5 e *11) em pacientes brasileiros em terapia crônica com warfarina estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e são similares às frequências relatadas anteriormente em brasileiros saudáveis.
- Os polimorfismos 3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A de *VKORC1* em brasileiros ocorrem em forte desequilíbrio de ligação, conforme relatado para outros grupos populacionais.
- O haplótipo *VKORC1* GTGA é o mais frequente em pacientes brasileiros que fazem uso crônico do anticoagulante oral warfarina.
- Os indivíduos que expressam genótipos variantes de *CYP2C9* (incluindo os alelos *2, *3, *5 e *11), requerem doses de warfarina significativamente menores, quando comparados aos indivíduos selvagens (*CYP2C9**1/*1).
- Pacientes heterozigotos ou homozigotos variantes para *VKORC1* 3673G>A, 5808T>G e 6853G>C, apresentam uma redução significativa na dose requerida de warfarina, quando comparados aos pacientes homozigotos selvagens. Contrariamente, pacientes *VKORC1* 9041GG requerem doses significativamente menores que os indivíduos heterozigotos ou homozigotos variantes.
- 51% da variação na dose requerida de warfarina, dos 390 pacientes analisados, são explicados por variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas

(idade, peso, indicação do tratamento com warfarina, uso concomitante de amiodarona e sinvastatina), conforme algoritmo desenvolvido para esta população.

5.2. CONTRIBUIÇÃO DO INR NA DOSE REQUERIDA DE WARFARINA

- A adição de uma única medida de INR ao algoritmo desenvolvido para a população brasileira aumenta o coeficiente de correlação de 0,51 para 0,60, e não diminui o poder preditivo das variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*).

5.3. CONSÓRCIO INTERNACIONAL DE FARMACOGENÉTICA DA WARFARINA

- A utilização de um grande número de pacientes de diferentes países mostrou a eficiência do algoritmo farmacogenético, envolvendo variáveis genéticas (genótipos *CYP2C9* e *VKORC1*) e não genéticas (idade, peso, altura, etnia, e medicamentos associados - carbamazepina, fenitoína, rifampicina ou amiodarona), em prever a dose requerida de warfarina.
- O algoritmo farmacogenético apresenta um coeficiente de correlação significativamente maior do que o algoritmo baseado apenas em fatores clínicos ou do que o modelo de dose fixa.
- O algoritmo farmacogenético é especialmente importante para os pacientes que requerem doses menores que 21mg por semana ou maiores que 49mg por semana,

representando um grupo de pacientes mais suscetíveis aos efeitos colaterais provocados pelo anticoagulante oral warfarina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999; 353:717-9.

Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol*, 2003; 56:653-7.

Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ e cols. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, 2000; 67:444-61.

Anderson JL, Horne BD, Stevens SM e cols. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*, 2007; 116:2563-70.

Ansell J, Hirsh J, Pollen L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004; 126:204S-33S.

Aquilante CL, Langae TY, Lopez LM e cols. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin. Pharmacol. Ther*, 2006; 79:291-302.

Aynacioglu As, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P e cols. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol*, 1999; 48:409-15.

Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008; 64:953-60.

Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 2004; 2:2118–32.

Blann AD, Landray MJ, Lip GYH: Abc of antithrombotic therapy; an overview of antithrombotic therapy. *J list BMJ*, 2002; 325:762-5.

Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, Lorient MA, Samama MM. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *J Thromb Haemost*, 2005; 3:1533Q5.

Bourrie M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Role of cytochrome P450 2C9 in irbesartan oxidation by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1999; 27:288-296.

Brockmüller J, Tzvetkov MV. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008; 64:133-57.

Buitenhuis HC, Soute BA, Vermeer C. Comparison of the vitamins K1, K2 e K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochim Biophys Acta*, 1990; 1034:170-75.

Bulário eletrônico da Anvisa. Ministério da Saúde. Disponível via URL:<http://www.bulario.bvs.br>. Acessado em abril de 2009.

Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*, 1997; 272: 29068–75.

Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ e cols. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res*, 2007; 5:8-16. Erratum, *Clin Med Res* 2007;5:142.

Caldwell MD, Awad T, Johnson JA e cols. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*, 2008; 111:4106–12.

Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB e cols. Genotypes of the cytochrome P450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2006; 22:191–97.

Cooper GM, Johnson JA, Langae TY e cols. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood*, 2008; 112:1022-27.

D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M. Oral anticoagulants: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors. *Blood Rev*, 2008; 22:127-40.

Degtyarenko KN & Archakov AI. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS*, 1993; Lett 332: 1-8.

Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB e cols. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol*, 2001; 60:382-7.

Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS e cols. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics*, 2008; 9:267–76.

FDA clears genetic lab test for warfarin sensitivity. Acessado em março de 2009. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NWES/2007>

FDA approves updated warfarin prescribing information. Acessado em março de 2009. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NWES/2007/NEW01684.html>

Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E e cols. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect of human cytochrome P450 and implication for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 1999; 27:410-16.

Freeman GH, Halton JH. Note on an exact treatment of contingency, goodness-of-fit and other problems of significance. *Biometrika*, 1951; 38:141-49.

Fuchshuber-Moraes M, Perini JA, Roskopf D, Suarez-Kurtz G. Exploring warfarin pharmacogenomics with the extreme-discordant-phenotype methodology: impact of FVII polymorphisms on stable anticoagulation with warfarin. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009.

Gaekigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M e Leeder JS. Cytochrome P450C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol*, 2001; 79:841-7.

Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJG, Agúndez JAG. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol*, 2001; 57:47-9.

Gage BF, Eby C, Milligan PE e cols. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 2004;91:87–94.

Gage B. F. Pharmacogenetics-Based Coumarin Therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:467-73.

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

Gage B, Eby C, Johnson J e cols. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; 84, 326–31.

Geisen C, Watzka M, Sittinger K e cols. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2005; 94, 773–9.

GENE-POP disponível na internet via <URL:http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2.html. Acessado em maio de 2008.

Ghahramani P, Elis SW, Lennard MS, Ramsay LE, Tucker GT. Cytochromes P450 mediating the N-demethylation of amitriptyline. *Br J Clin Pharmacol*, 1997; 43:137-44.

Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*, 1994; 4: 285-99.

Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*. 2003; 4(12):937-47. Review. Erratum in: *Nat Rev Genet*. 2004; 5:76.

Goldstein DB, Need AC, Singh R, Sisodiya SM. Potential genetic causes of heterogeneity of treatment effects. *Am J Med* 2007; 120:S21-5.

Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, 10ª edição, 2003.

Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2004; 29:289-92.

Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S and Spurr NK. A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics*, 1995; 28:328-32.

Haplo-stats disponível na internet via <URL: http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm. Acessado em maio de 2008.

Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N e cols. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dhydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 2002; 53:596-603.

Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005;93:23Q6.

Hill CE, Duncan A. Overview of pharmacogenetics in anticoagulation therapy. *Clin Lab Med*. 2008; 28:513-24.

Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL e cols. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*, 2002; 13:1690-98.

Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR e cols. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 1998; 114:445S-69S.

Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, e cols. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 2001; 119:8S-21S.

Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, online. Acessado em abril de 2009. www.imm.ki.se/CYPalleles

Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat. Rev. Genet*. 2005; 6:287-98.

Hylek EM. Complications of oral anticoagulant therapy: bleeding and nonbleeding, rates and risk factors. *Semin Vasc Med*. 2003; 3:271-8.

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebe DW, editors. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee Web site. Available from: URL: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>.

Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. *N Engl J Med*. 2008; 358:637-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) - Censo Brasileiro 2000: Disponível na internet via <URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2000>. Acessado em abril de 2009.

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009; 360:753-64.

Jaffer AK and Bragg L. Practical Tips for warfarin dosing and monitoring. *Cleveland Clinic J Med* 2003; 70:361-71.

Kalow W. *Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs*. W.B.Saunders, Philadelphia, 1962.

Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther*. 1997; 73:67-74.

Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Goldstein JA, Dalton JT. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide, and nifedipine in a individual homozygous for the CYP2C9 3 allele. *Pharmacogenetics*, 1999; 9:71-80.

Kim MJ, Huang SM, Meyer UA, Rahman A, Lesko LJ. A regulatory science perspective on warfarin therapy: a pharmacogenetic opportunity. *J Clin Pharmacol*. 2009; 49:138-46.

Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y e cols. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res*. 2007;120:181-6.

King BP, Khan TI, Aithal GP, Kamali F, Daly AK. Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. *Pharmacogenetics*, 2004; 2:813-22.

Kirchheiner J, Meineke I, Freytag G, Meisel C, Roots I, Brockmoller J. Enantiospecific effects of cytochrome P450 2C9 amino acid variants on ibuprofen pharmacokinetics and on the inhibition of cyclooxygenases 1 and 2. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 72:62-75.

Kirchheiner J, Brockmoller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W e cols. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 71:286-96.

Kirchheiner J, Meineke I, Muller G, Bauer S, Rohde W e cols. Influence of *CYP2C9* and *CYP2D6* polymorphisms on the pharmacokinetics of nateglinide in genotyped healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*, 2004; 4:267-78.

Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 2005; 77:1-16.

Lal S, Sandanaraj E, Jada SR e cols. Influence of APOE genotypes and VKORC1 haplotypes on warfarin dose requirements in Asian patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 65:260-4.

Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med* 1993; 95:315–28.

Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Differences in flurbiprofen pharmacokinetics between *CYP2C9**1/*1, *1/*2, and *1/*3 genotypes. *Pharmacokinetics and Disposition*, 2003; 58:791-94.

Lee SC, Ng SS, Oldenburg J e cols. Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2006; 79: 197–205.

Lesko L.J. The Critical Path of Warfarin Dosing: Finding an Optimal Dosing Strategy Using Pharmacogenetics. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 2008; 84.

Levine MN, Raskob G, Beyth RJ, Kearon C, Schuhman S: Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment – the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126:2875.

Li, T. Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004; 427, 541–44.

Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Stein CM, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2008;113:3925-30.

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

Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, Acton RT, Beasley TM. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin response during initiation of therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2009.

Lindh JD, Lundgren S, Holm L, Alfredsson L, Rane A. Several-fold increase in risk of overanticoagulation by CYP2C9 mutations. *Clin Pharmacol Ther*. 2005; 78:540-50.

Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65:365-75.

LLerena A, Dorado P, O'Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML.. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenetics*, 2004; 4:403-06.

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

McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L e cols. Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther*, 1999; 65:348-52.

McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CH, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin k1 oxidase: an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol*. 2009.

Meehan RR, Gosden JR, Rout D e cols. Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *Am J Hum Genet*, 1988; 42:429-39.

Michaud V, Vanier MC, Brouillette e cols. Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2008; 83, 740–8.

Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE e cols. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood*. 2007; 110(5):1511-5.

Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P450 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 1998; 45:525-38.

Momary, K.M., Shapiro, N.L., Viana, M.A., Nutescu, E.A., Helgason, C.M. & Cavallari, L.H. Factors influencing warfarin dose requirements in African-Americans. *Pharmacogenomics* 2007; 8, 1535–44.

Morin S, Bodin L, Lorient MA e cols. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 5:403-14.

Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc* 1957; 165:835-7.

Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S e cols. Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. *J Hum Genet* 2006; 51:249Q53.

Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 1997; 7:405-9.

Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different *CYP2C9* genotypes. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 72:326-32.

Obayashi K, Nakamura K, Kawana J e cols. VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006; 80, 169–78.

Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Müller CR. VKORC1: molecular target of coumarins. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 Suppl 1:1-6.

O' Reilly, R. A. Warfarin metabolism and drug-drug interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1987; 214:205-12.

Ozgon GO, Bebek N, Gul G, Cine N. Association of MDR1 (C3435T) polymorphism and resistance to carbamazepine in epileptic patients from Turkey. *Eur Neurol.* 2008; 59:67-70.

Palkimas MP Jr, Skinner HM, Gandhi PJ, Gardner AJ. Polymorphism Induced Sensitivity to Warfarin:A Review of the Literature. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2003; 15:205–12.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:177-82.

Pena SDJ, Silva-Carvalho DR, Silva-Alves J e Prado VF. Retrato Molecular do Brasil. *Ciência Hoje*, 2000; 27:16-25.

Perini JA, Vianna-Jorge R, Brogliato AR, Suarez-Kurtz G. Influence of CYP2C9 genotypes on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of piroxicam. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78:362-9.

Perini JA, Suarez-Kurtz G. Impact of CYP2C9*3/*3 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of piroxicam. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80:549-51.

Perini JA, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Suarez-Kurtz G. VKORC1 polymorphisms in Amerindian populations of Brazil. *Pharmacogenomics.* 2008; 9:1623-9.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E e cols. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 84:722-8.

Programa de estatística disponível na internet via <URL: faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html e <http://department.obg.cuhk.edu.hk> Acessado em maio de 2008.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* Guanabara Koogan, 4ª edição, 2001.

Rede Nacional de Farmacogenética / Farmacogenômica (REFARGEN). Disponível na internet via <URL: <http://www.refargen.org.br>. Acessado em abril de 2009.

Redman AR. Implications of cytochrome P450 2C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing. *Pharmacotherapy.* 2001; 21:235-42.

Relling MA, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450 in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 252:442-7.

Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997; 29: 413-580.

Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*. 1994; 4:39-42.

Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:477-94.

Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF e cols. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005; 352:2285-93.

Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450 IIC subfamily. *Biochemistry*, 1991; 13:3247-55.

Roses AD. Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nature Reviews Genetics*, 2004; 5:645-56.

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V e cols. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427:537Q41.

Schelleman H, Chen Z, Kealey C e cols. Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007; 81:742–7.

Schelleman H, Chen J, Chen Z e cols. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 84:332-9.

Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN; American College of Chest Physicians. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008; 133:257S-98S.

Schwarz UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur. J. Clin. Investigation*, 2003; 33:23-30.

Sconce EA, Khan TI, Wynne HA e cols. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106:2329Q33.

Sconce, E.A., Daly, A.K., Khan, T.I., Wynne, H.A. & Kamali, F. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. *Pharmacogenet. Genomics* 2006; 16:609–11.

Scordo MG, Aklillu E, Yasar U, Dahl ML, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 52:447-50.

Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S e cols. 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*. 2004; 103:2630-5.

Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H e cols. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 2:175-82.

Stafford DW. The vitamin K cycle.. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1873-8.

Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47:565-94.

Suarez-Kurtz G, Vianna-Jorge R, Perini JA, Pena SD. Detection of CYP2C9*5 in a white Brazilian subject. *Clin Pharmacol Ther*. 2005; 77:587-8.

Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:196-201.

Suarez-Kurtz, G. & Pena, S.D. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr. Drug Targets* 2006; 7:1649–58.

Suarez-Kurtz G, Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SD, Struchiner C. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. *Pharmacogenomics*. 2007; 8:1299-306

Suarez-Kurtz, G., Vargens, D.D., Struchiner, C.J., Bastos-Rodrigues, L. & Pena, S.D. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet. Genomics* 2007; 17:765–71.

Suarez-Kurtz, G. & Pena, S.D.J. Pharmacogenetics in the Brazilian population. In: *Pharmacogenomics in Admixed Populations* (ed. Suarez-Kurtz, G.) 75–98 (Landes Bioscience, Austin, TX, 2007) <<http://www.eurekah.com/chapter/3157>>.

Suarez-Kurtz G. The implications of population admixture in race-based drug prescription. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83:399-400.

Suarez-Kurtz G, Perini JA, Silva-Assunção E, Struchiner CJ. Relative contribution of VKORC1, CYP2C9, and INR response to warfarin stable dose. *Blood*. 2009; 113:4125-6.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA e cols. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996; 6:341-9.

Tai G, Farin F, Rieder MJ, Dreisbach AW, Veenstra DL, Verlinde CL, Rettie AE. In-vitro and in-vivo effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15:475-81.

Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics*. 2000; 10:95-104.

Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2001; 40:587-603.

Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA e cols. 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*. 2006; 16:101-10.

Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S e cols. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet*. 2009; 5:e1000433.

Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P450 *CYP2C9* polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood*, 2000; 96:1816-9.

Tham LS, Goh BC, Nafziger A, Guo JY, Wang LZ, Soong R, Lee SC. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 80:346-55.

Thijssen HH, Verkooyen IW, Frank HL. The possession of the *CYP2C9**3 allele is associated with low dose requirement of acenocoumarol. *Pharmacogenetics*, 2000; 10:757-60.

Thompson & Thompson. *Genética médica*. Guanabara Koogan, 7ª edição, 2003.

Tie JK e cols. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/co-translocation. *J Biol Chem* 2005; 280:16410-6.

Tie JK, Stafford DW. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. *Vitam Horm.* 2008; 78:103-30.

Triplett DA. Current recommendation for warfarin therapy – use and monitoring. *Med Clin of North Am* 1998; 82: 601-11.

Vargens DD, Almendra L, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of the GNB3 825C>T polymorphism among Brazilians: impact of population structure. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64:253-6.

Veenstra DL, Blough DK, Higashi MK, Farin FM, Srinouanprachan S, Rieder MJ, Rettie AE. CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 77:353-64.

Veenstra DL, You JH, Rieder MJ e cols. Association of vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:687Q91.

Veronese ME, Mackenzie PI, Doecke CJ, McManus ME, Miners JO, Birkett DJ. Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human cytochrome P450 2C9. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 175:1112-8.

VG2 disponível na internet via <URL:<http://pga.gs.washington.edu/VG2.html>. Acessado em maio de 2008.

Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76:18-26.

Wadelius M, Chen LY, Downes K e cols. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 2005; 5:262-70.

Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J.* 2007; 7:99-111.

Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics*, 1995; 5:37-42.

Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadée W. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood.* 2008; 112:1013-21.

Wittkowsky AK. Warfarin and other coumarin derivatives: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions. *Semin Vasc Med.* 2003; 3:221-30.

Wu AH. Use of genetic and nongenetic factors in warfarin dosing algorithms. *Pharmacogenomics* 2007; 8:851-61.

Yamazaki H, Inoue K, Shimada T. Roles of two allelic variants (Arg144Cys and Ile359Leu) of cytochrome P4502C9 in the oxidation of tolbutamide and warfarin by human liver microsomes. *Xenobiotica.* 1998; 28:103-15.

Yasar M, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 254:628-31.

Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, et al. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2002; 299:25-8.

Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res.* 2007; 120:1-10.

Yoon YR, Shon JH, Kim MK e cols. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol*, 2001; 51:277-80.

Yuan HY, Chen JJ, Lee MT e cols. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; 14:1745Q51.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 392:1093-108.

Zhao F, Loke C, Rankin SC, Guo JY, Lee HS e cols. Novel *CYP2C9* genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76:210-9.

Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK e cols. Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin. Chem*. 2007; 53:1199–1205.

Zimmerman, A. & Matschiner, J. T. Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem. Pharmacol*. 1974; 23:1033–40.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I

Projeto submetido à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP e ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras - INCL

DIVISÃO DE FARMACOLOGIA / INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
E
AMBULATÓRIO DE ANTICOAGULAÇÃO / INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
LARANJEIRAS

Projeto de Ensaio Clínico

Farmacogenética dos anticoagulantes na população brasileira

Investigador principal: Guilherme Suarez Kurtz

ÍNDICE

	pg.
I	
INTRODUÇÃO e OBJETIVO	3
II	
JUSTIFICATIVA	5
III	
METODOLOGIA	7
IV	
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	8
V	
DECLARAÇÃO DE TORNAR PÚBLICO OS RESULTADOS	9
VI	
EQUIPE	9
VII	
CRONOGRAMA DA PESQUISA	9
VIII	
FINANCIAMENTO DO PROJETO	10
IX	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

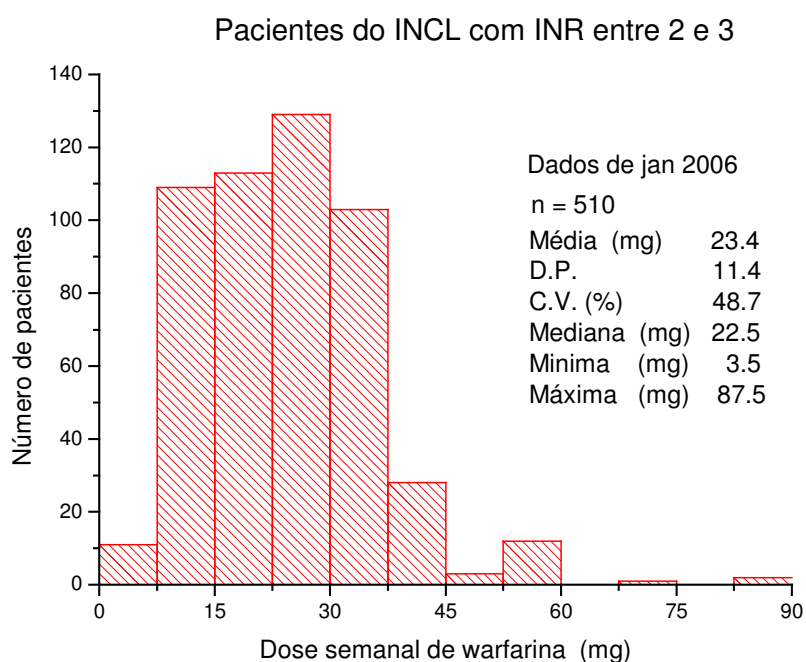
I. INTRODUÇÃO e OBJETIVO

A farmacogenética/farmacogenômica visa explicar as bases genéticas das variações individuais aos fármacos. Os dois extremos da faixa de variação, efeitos adversos (e.g. por lenta eliminação do xenobiótico) ou refratariedade (e.g. por inativação ou excreção excessivamente rápidas) são reconhecidos como fenótipos farmacogenéticos. Geralmente estes fenótipos apresentam distribuição irregular nas famílias e dependem de variação simultânea em vários genes. O objetivo maior da farmacogenética é catalogar todos os genes cuja variação contribui significativamente para fenótipos farmacológicos. Este catálogo será essencial para o desenvolvimento da era da terapêutica personalizada, baseada no estabelecimento de perfis genômicos. Há ampla documentação experimental de que a distribuição de alelos variantes de genes de importância farmacogenética, varia entre as populações e que isto é especialmente significativo em populações formadas por mistura de duas ou mais populações ancestrais, como sabemos ser o caso da população brasileira (Suarez-Kurtz, 2005). Somos uma mistura de populações fundadoras ameríndias, européias e africanas, e as proporções relativas de ancestralidade de cada indivíduo variam. Se o risco de uma doença ou a predisposição a um fenótipo farmacológico varia com as proporções de mistura (ou seja, se eles diferem nas populações ancestrais) isto levará à confusão de associações do fenótipo com o genótipo em qualquer loco no qual as freqüência alélicas variam entre as populações ancestrais. Uma importante consequência farmacogenética disto é a inadequação da extrapolação livre de dados colhidos em populações relativamente homogêneas – como as dos países industrializados em que se desenvolvem a maioria dos medicamentos de uso clínico – para populações altamente miscigenadas como é o caso do Brasil (Reis e cols, 2003; Vianna-Jorge e cols., 2004; Vasconcelos e cols., 2005). Este fato motivou a criação de uma Rede Nacional de Farmacogenômica – REFARGEN -, coordenada pelo pesquisador principal do presente projeto, e que congrega pesquisadores de todas as regiões do país (ver portal www.refarfen.org.br)

O projeto que propomos desenvolver na forma de colaboração entre o Instituto Nacional de Câncer (INCa) e o Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras (INCL) se enquadra nos propósitos da REFARGEN. O **OBJETIVO PRINCIPAL** deste projeto é investigar a influência de variáveis farmacogenéticas na resposta terapêutica ao anticoagulante cumadina, em pacientes do ambulatório de anticoagulação do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras (AA-INCL).

O efeito anticoagulante da cumadina é exemplo marcante da variabilidade intraindividual na resposta farmacológica em todas as populações estudadas (Rieder e cols., 2005; Takahashi e cols., 2006). Dados do próprio AA-INCL documentam isto de forma exuberante na nossa população, como mostrado no gráfico abaixo. As doses semanais de cumadina necessárias para manter o INR na faixa de 2 - 3, variaram entre 3,75 mg a 87,5 mg em 560 pacientes atendidos na AA-INCL no mês de janeiro de 2006 (Figura 1). Parte desta variabilidade é atribuída a fatores demográficos, tais como peso corporal e idade, entretanto, a influência de variáveis genéticas é inquestionável (Kamali e cols., 2004; Wadelius e cols., 2005). Estudos realizados na Alemanha (Geisen e cols., 2005), nos Estados Unidos (Rieder e cols., 2005), na Itália (D'Andrea e cols., 2005), no Japão (Takahashi e cols., 2006), na Suíça (Wadelius e cols., 2005) e no Reino Unido (Sconce e cols., 2005) mostraram que polimorfismos genéticos dos genes *CYP2C9* e *VKORC1* respondem por 34 a 55% da variabilidade inter-individual na dose de cumadina necessária para obter efeito anticoagulante adequado. Não há informação equivalente na população brasileira, o que constitui a motivação principal do presente estudo.

Figura 1. Distribuição dos pacientes do AA-INCL pelas doses semanais de cumadina necessárias para manter o INR na faixa entre 2 – 3.



A cumadina interfere na γ -carboxilação pós-transdução dos radicais de ácido glutâmico nos fatores da coagulação II, VII, IX e X. Exerce esse efeito ao impedir a redução da vitamina K. É administrada por via oral, sofre absorção rápida e completa pelo trato gastrintestinal. Possui pequeno volume de distribuição e liga-se fortemente a albumina plasmática. A concentração máxima no sangue ocorre uma hora após a sua ingestão, mas em virtude de seu mecanismo de ação, esse pico não coincide com o efeito farmacológico máximo, que ocorre cerca de 48 horas mais tarde. O efeito de uma dose única só começa depois de 12-16 horas e dura 4-5 dias. A cumadina é metabolizada pelo sistema hepático P450 de oxidases de função mista, e sua meia-vida é muito variável, sendo da ordem de 40 horas em muitos indivíduos.

O uso terapêutico da cumadina exige um cuidadoso equilíbrio entre a administração de uma dose muito pequena, que não modifica a coagulação desregulada, e o uso de uma quantidade excessiva, causando hemorragia. A terapia é complicada não apenas devido ao fato de o efeito de uma determinada dose ser apenas observado dois dias após a sua administração, mas também em virtude da existência de numerosas condições que modificam a sensibilidade à cumadina, incluindo interações com outros medicamentos (Rang e cols., 2001).

II - JUSTIFICATIVA

Alvo do estudo: a ampla variabilidade inter-individual no efeito anticoagulante da cumadina, evidente na população brasileira (cf. gráfico acima), oferece oportunidade excepcional para a avaliação do impacto da farmacogenética na prática médica; isto é, o presente projeto visa validar num cenário naturalista (são mantidas as condições vigentes de acompanhamento ambulatorial dos pacientes) as conclusões obtidas em ensaios clínicos controlados, realizados no exterior.

Escolha das variáveis farmacogenéticas: Os genes selecionados para o estudo são o *CYP2C9* e o *VKORC1*, e sua escolha se baseia em:

- O gene *CYP2C9* codifica a enzima de fase I, CYP2C9, responsável pela metabolização do S-cumadina, que é o principal isômero responsável pela ação

anticoagulante deste medicamento. O gene *CYP2C9* é polimórfico, já tendo sido descritas até o momento diversas formas variantes (www.imm.ki.se/CYPalleles). O alelo com maior frequência é considerado a forma selvagem do gene e designado *CYP2C9*1*. Os alelos variantes *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*, que serão objeto do presente estudo, codificam enzimas com atividade reduzida e sua identificação prévia permite reduzir a incidência de efeitos adversos (hemorragias) na fase inicial do tratamento com cumarínicos (Margaglione e cols., 2000; Palkimas e cols., 2003). O nosso grupo iniciou, em 2003, um estudo sistemático da frequência alélica e genotípica do gene *CYP2C9* na população brasileira (Vianna-Jorge e cols., 2004; Perini e cols., 2005; Suarez-Kurtz e cols., 2005) e os resultados obtidos estão condensados na tabela 1, abaixo:

Tabela 1. Alelos e genótipos de *CYP2C9* em brasileiros

	n ^a	Alelos (%) ^b			Genótipos (%) ^b					
		*1	*2	*3	1/1	1/2	1/3	2/2	2/3	3/3
Branços	136	80	12	8	63	20	13	2	0	1.5
Mistos	118	86	7	7	73	13	13	0	1	0
Negros	77	92	5	3	87	7	4	0	2	0
Total	331	85	9	6	72	14	11	1	1	0.6

^a número de indivíduos; ^b porcentagens em cada grupo populacional

- O gene *VKORC1* codifica o complexo 1 vitamina K epóxido redutase que é responsável por reciclar a vitamina K 2,3-epóxido em vitamina K hidroquinona. A vitamina K na sua forma reduzida (hidroquinona) é essencial para a ativação dos fatores de coagulação II, VII, IX e X (Palkimas e cols., 2003). O gene *VKORC1* é polimórfico, já tendo sido descritos polimorfismos genéticos que aumentam ou diminuem a atividade do complexo vitamina K epóxido redutase, o que influencia a resposta farmacodinâmica da cumadina (Rieder e cols., 2005; Wadelius e cols., 2005; Geisen e cols., 2005; D'Andrea e cols., 2005; Sconce e cols., 2005; Takahashi e cols., 2006). As variantes alélicas mais estudadas e que demonstraram interferir de forma significativa na atividade do complexo VKORC1,

estão mostradas na tabela 2, juntamente com suas frequências alélicas. Os alelos variantes rs 9934438, rs 9923231 e rs 2359612 ocorrem em desequilíbrio de ligação (Wadelius e cols., 2005), o que facilita a correlação entre o fenótipo e o genótipo, já que, a identificação de um único polimorfismo é o suficiente para determinar a presença dos outros dois alelos variantes. Desta maneira, os alelos a serem investigados neste estudo serão rs 9934438 e rs 7294.

Tabela 2. Alelos VKORC1 em diferentes etnias.

Alelo ^a	Europeus	Africanos	Asiáticos
	Euro-Americanos	Afro-Americanos	
rs 9934438	39-42	9-14	89-95
rs 9923231	39		
rs 2359612	41		
rs 7294	35-39		

porcentagens em cada grupo étnico;

^anomenclatura conforme PgENI (<http://pgeni.im.wustl.edu/snps.asp>)

III - METODOLOGIA

Recrutamento de pacientes: Serão recrutados 1000 pacientes cadastrados no AA-INCL.

- ***Critérios de inclusão:***

Adultos, (acima de 18 anos), de ambos os sexos, cadastrados no AA-INCL, mantidos em tratamento com cumadina sódica para qualquer uma de suas indicações terapêuticas e que manifestem sua concordância em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- ***Critérios de exclusão:***

Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

- **Obtenção do consentimento pós-informado:**

Os pacientes convidados a participar do presente estudo, receberão o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, (anexo 1) e serão orientados a lê-lo cuidadosamente e a inquirir a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto. Os indivíduos que concordarem com as condições estipuladas no TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, deverão assiná-lo antes de serem incluídos no protocolo experimental.

- **Obtenção de dados demográficos**

Os participantes do estudo receberão o QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO (anexo 2), que visa à obtenção de dados pessoais de identificação e informações quanto à origem étnica. Tais informações destinam-se a assegurar a abrangência e restringir eventuais tendências da amostra populacional. Isto é especialmente significativo em populações formadas por mistura de duas ou mais populações ancestrais, como sabemos ser o caso da população brasileira que é uma mistura de populações fundadoras ameríndias, européias e africanas (com uma pequena contribuição asiática mais recente). Neste caso, as proporções relativas de ancestralidade de cada indivíduo variam. Se a predisposição a um fenótipo farmacológico varia com as proporções de mistura (ou seja, se eles diferem nas populações ancestrais) isto levará à confusão de associações do fenótipo com o genótipo em qualquer loco no qual as frequências alélicas variam entre as populações ancestrais. Desta maneira, as informações quanto à origem étnica serão empregados para uma correlação entre a cor auto-definida pelo indivíduo; e frequências alélicas e genótípicas dos genes *CYP2C9* e *VKORC1*. Os dados demográficos serão empregados também para eventuais comparações com estudos semelhantes realizados em diferentes grupos étnicos. Todas as informações pessoais serão mantidas em sigilo e serão utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no presente estudo.

Coleta de amostras de sangue: As coletas de sangue de veia periférica serão feitas no AA-INCL, por ocasião das visitas de acompanhamento dos pacientes. O sangue coletado será usado para:

- a) as análises normalmente realizadas no INCL para avaliação clínica dos pacientes, especialmente a determinação do INR;
- b) extração do DNA genômico;
- c) quantificar as concentrações plasmáticas de S-cumadina.

Etapa laboratorial

- **Extração de DNA genômico**, empregando procedimentos de uso corrente na Divisão de Farmacologia do INCA.
- **Análise de polimorfismos**: a amplificação de fragmentos dos genes em estudo (*CYP2C9* e *VKORC1*) e a determinação das frequências alélica, genotípica e/ou haplotípica referentes a variantes destes genes será realizada na Divisão de Farmacologia do INCA – que tem demonstrado experiência nestes procedimentos (Reis e cols., 2003; Vianna-Jorge e cols., 2004; Vasconcelos e cols., 2005; Suarez-Kurtz e cols., 2005) – ou mediante contratação de prestadores de serviço especializados (KBiosciences ou Prevention Genetics).
- **Análise das concentrações de S-cumadina**: serão quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme descrito anteriormente por Kamali e cols., (2004). Este procedimento será realizado na Divisão de Farmacologia do INCA – que tem demonstrado experiência em estudos de bioequivalência que utilizam esta técnica.

IV – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Seleção de Pacientes:

- 1) Serão selecionados no banco de dados do AA-INCL, os pacientes que estiverem com a dose de cumadina estável e com o INR na faixa de 2-3, nas últimas três consultas.
- 2) Os pacientes com este perfil, na próxima visita de rotina ao AA-INCL, serão convidados a participar do presente estudo. Concordando em participar do estudo, irão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e preencher o questionário demográfico.

Amostra: Da amostra de sangue que é normalmente coletada para a determinação do INR, uma parte do volume (5mL) será utilizada para a extração do DNA genômico e para a quantificação da cumadina.

Análise dos Dados: Modelos de regressão serão usados para determinar a influência de cada variável em estudo (idade, peso, interação medicamentosa, INR, depuração de cumadina, genótipo *CYP2C9* e *VKORC1*) nas doses individuais de cumadina.

V. DECLARAÇÃO DE TORNAR PÚBLICO OS RESULTADOS

Todas as informações pessoais obtidas durante o estudo estarão disponíveis apenas para os investigadores envolvidos no projeto. Os resultados obtidos serão divulgados em reuniões científicas e congressos e serão publicados em revistas científicas indexadas de circulação internacional, mantendo-se em sigilo a identidade dos voluntários.

VI. EQUIPE DA PESQUISA

Pesquisador Principal: Guilherme Suarez-Kurtz, médico, Doutor em Medicina, Chefe da Divisão de Farmacologia do INCA

Pesquisadores Colaboradores:

Divisão de Farmacologia, INCA

- Jamila Perini, farmacêutica, mestre em Bioquímica Médica/UFRJ, doutoranda/INCA
- Daniela De Giacomo Vargens, biomédica, mestre em Bioquímica Médica/UFRJ

Ambulatório de coagulação – ICL

- Augusto Elias Zaffalon Bozza, médico
- Edmilson Assunção e Silva, médico
- Flávio Rangel da Silva, enfermeiro

VII. CRONOGRAMA DA PESQUISA

O recrutamento de participantes ocorrerá durante um máximo de seis meses a contar da aprovação do protocolo pelo CEP do INCL. Os estudos de genotipagem e dosagem de cumadina e vitamina K serão realizados em intervalos variáveis, dependendo da taxa de recrutamento, de forma a otimizar a utilização dos equipamentos e kits.

VIII. FINANCIAMENTO DO PROJETO

Os custos referentes à genotipagem das variáveis farmacogenômicas e à dosagem de cumadina no sangue serão financiados com recursos concedidos ao pesquisado principal por agência de fomento nacional (CNPq). A determinação do INR nos pacientes em tratamento do AA-INCL faz parte do acompanhamento de rotina destes pacientes e, portanto, não ocasiona despesas adicionais.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bastos-Rodrigues L, Pimenta J & Pena SDJ. *Câncer Lett.* 2006 (no prelo)

D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R e cols. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):645-9.

Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L e cols. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2005 Oct;94(4):773-9.

Greenblatt DJ, von Moltke LL. Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods. *J Clin Pharmacol.* 2005 Feb;45(2):127-32.

Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, Berg RL, Glurich I, Burmester JK. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. *Pharmacogenetics.* 2004 Aug;14(8):539-47

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebe DW, editors. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee Web site. Available from: URL: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) - Censo Brasileiro 2000: Disponível na

internet via <URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2000>. Acessado 7 de junho de 2005.

Kamali F, Khan TI, King BP, Frearson R, Kesteven P, Wood P, Daly AK, Wynne H. Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Mar;75(3):204-12.

Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A e cols. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost.* 2000 Nov;84(5):775-8.

Palkimas MP Jr, Skinner HM, Gandhi PJ, Gardner AJ. Polymorphism induced sensitivity to warfarin: a review of the literature. *J Thromb Thrombolysis.* 2003 Jun;15(3):205-12.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):177-82.

Perini JA, Vianna-Jorge R, Brogliato AR and Suarez-Kurtz. Influence of CYP2C9 genotypes on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of piroxicam. *Clin Pharm Ther.*, 2005.
Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. *Genetics* 2000; 155:945-959

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. Guanabara Koogan. 2001, 4ª edição.

Reis M, Santoro A, Suarez-Kurtz G. Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians. *Pharmacogenetics.* 2003 Jun;13(6):371-3.

Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS e cols. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 2005 Jun 2;352(22):2285-93.

Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L e cols. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements:

proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.

Suarez-Kurtz, G. Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 Apr;26(4):196-201

Suarez-Kurtz, G, Pena SDJ. Invited Review: Pharmacogenomics in the Américas: Impact of Population Admixture. *Curr Drug Targets*, 2006 (no prelo)

Suarez-Kurtz G, Vianna-Jorge R, Perini JA, Pena SD. Detection of CYP2C9*5 in a white Brazilian subject. *Clin Pharmacol Ther*, 2005; 77(6):587-588.

Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie e cols. 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*. 2006 Feb;16(2):101-110.

Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. CYP2A6 genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):42-8

Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76(1):18-26.

Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghorri J, Hunt S e cols. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(4):262-70.

7.2. ANEXO II

Aprovação do projeto pela CONEP

7.3. ANEXO III

Aprovação do projeto pelo CEP do INCL

7.4. ANEXO IV

Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Farmacogenética dos anticoagulantes

Investigador principal : Dr. Guilherme Suarez-Kurtz,

Divisão de Farmacologia / INCa

Nome do Paciente: _____

Código do Paciente: _____

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo entender as diferenças individuais no efeito anticoagulante do medicamento cumadina, que você está tomando. Muitos fatores podem influir na resposta a este medicamento e neste estudo estamos interessados em estudar alguns fatores genéticos. Nós pretendemos incluir neste estudo, durante um período de seis meses, 1000 (mil) indivíduos cadastrados no ambulatório de coagulação do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras (INCL), como é o seu caso. Você já foi pré-selecionado no Banco de Dados do ambulatório de coagulação por estar com a dose de cumadina estável e com o INR na faixa de 2-3, nas últimas três consultas.

A sua participação no estudo é VOLUNTÁRIA, e caso você concorde em participar do estudo você deverá passar pelas seguintes etapas:

- entrevista com um profissional da saúde que lhe explicará as etapas e procedimentos do estudo e poderá esclarecer as suas dúvidas em relação a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Questionário Demográfico;
- assinatura deste TERMO DE CONSENTIMENTO
- preenchimento do QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO, que visa à obtenção de dados pessoais de identificação e informações quanto à origem étnica. Os dados demográficos serão empregados para eventuais comparações com estudos semelhantes realizados em diferentes grupos étnicos. Todas as informações pessoais serão mantidas em sigilo e serão utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no presente estudo.
- participação nos procedimentos do estudo, descritos a seguir.

Procedimentos do estudo

Durante as suas visitas periódicas ao INCL, para acompanhamento de seu tratamento com a cumadina, é normalmente coletada uma amostra de sangue para exames laboratoriais. Se você concordar em participar deste estudo, uma parte do sangue coletado será usada para obter uma amostra de seu DNA (material genético de características únicas para cada pessoa) para identificar as características dos genes denominados *CYP2C9* e *VKORC1*, que são importantes para o efeito anticoagulante da cumadina; e outra para quantificar as concentrações de cumadina no seu sangue.

Segurança do voluntário e Benefícios do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa do INCL aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro. A sua participação no estudo é voluntária e mesmo que concorde em participar, você tem o direito de desistir e interromper a sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão. Este estudo não trará nenhum benefício imediato para os pacientes participantes, que não receberão recompensa de qualquer espécie.

Confidencialidade

Todas as informações pessoais obtidas durante o estudo são estritamente confidenciais e estarão disponíveis apenas para os pesquisadores envolvidos no estudo. Os dados obtidos poderão ser publicados apenas com fins científicos, mas a sua identidade permanecerá em sigilo. Os voluntários que apresentarem tipo genético sugestivo de atividade alterada da enzima CYP2C9 e do complexo VKORC1 serão orientados em relação a eventuais tratamentos médicos. Caso você deseje confirmar o seu resultado, deverá entrar em contato com a Dr. Guilherme Suarez-Kurtz ou com a Dra Jamila Perini, na Divisão de Farmacologia do Instituto Nacional de Câncer no telefone (21) 3233-1440. O seu resultado será divulgado unicamente para você, mediante identificação pessoal.

Em caso de dúvidas

Você deve guardar cópia deste termo de consentimento e toda vez que tiver dúvidas sobre o protocolo do estudo, poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do INCL – no telefone (21) 2285-3344 ou o pesquisador responsável pelo estudo, Dr. Guilherme Suarez-Kurtz, no telefone (21) 3233-1440.

Esse é um documento em duas vias, e deve ser assinado pelo paciente, pelo pesquisador responsável e por duas testemunhas. Uma via ficará em posse do paciente e outra do entrevistador.

Assinatura _____ do
voluntário _____ Data ____/____/____.

Investigador principal Dr Guilherme Suarez Kurtz - CRM 52-11062-2

Assinatura _____ Data ____/____/____.

Testemunha 1

Assinatura _____ Data ____/____/____.

Testemunha 2

Assinatura _____ Data ____/____/____.

7.5. ANEXO V

Questionário aplicado no estudo

QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO

1	IDENTIFICAÇÃO	Nº de controle: <input type="text"/>
1.01 Data da Entrevista:	<input type="text"/> dd/mm/aaaa	1.02 Origem : <input type="text"/>
1.03 Nº da matrícula:	<input type="text"/>	
1.04 Nome:	<input type="text"/>	1.05 Tipo: <input type="checkbox"/> 1. paciente <input type="checkbox"/> 2. voluntário sadio/controle
1.06 Nome do entrevistador:	<input type="text"/>	

2	DADOS PESSOAIS		
2.01 Endereço:	<input type="text"/>		
2.02 Bairro:	<input type="text"/>		
2.03 Cidade:	<input type="text"/>	2.04 Estado:	<input type="text"/> (sigla)
2.05 Cep:	<input type="text"/> - <input type="text"/>	2.06 Telefone:	<input type="text"/> - <input type="text"/> (DDD) - 0000-0000
2.07 Celular:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2.08 E-mail:	<input type="text"/>		
2.10 Data de nascimento	<input type="text"/> Dia <input type="text"/> Mês <input type="text"/> Ano	2.11 Idade:	<input type="text"/> anos
2.12 Local do nascimento (estado) :	<input type="text"/>		
2.13 Sexo:	<input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino		
2.14 Peso:	<input type="text"/>	Altura:	<input type="text"/>
2.16 Grau de instrução?	<input type="checkbox"/> 1. Ensino Fundamental/1º grau/ <input type="checkbox"/> 2. Ensino Médio/2º grau/Normal <input type="checkbox"/> 3. Superior		

2.17 Qual a sua profissão? _____

2.18 Você faz atividade física regular? 1. Sim

2. Não

2.19 Qual o esporte que você pratica? _____

2.20 Há quanto tempo pratica este esporte? _____

2.21 Quantos dias na semana se dedica a este esporte? _____


3

HISTÓRIA DE TABAGISMO

As próximas perguntas são sobre uso de produtos derivados de tabaco.

3.01 Alguma vez na vida, fumou cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?


1. Sim

2. Não 

Passa pergunta 4.08

3.02 Somando todos os cigarros que o fumou na vida inteira, o total chega a **5 maços ou 100 cigarros**?

1. Sim


2. Não 

9. Ignorado

Passa pergunta 4.08

3.03 Atualmente fuma cigarros diariamente?

1. Sim

2. Não 

Passa pergunta 4.05

3.04 Quantos cigarros fuma por dia? _____


3.05 Com que idade começou a fumar? _____

3.06 Há quanto tempo que parou de fumar? _____

3.07 Quantos cigarros fumava por dia? _____

3.08 Alguma vez na vida, o(a) Sr.(a) fumou outro produto derivado do tabaco como charutos, cigarrilhas ou cachimbo?


1. Sim

2. Não 

Passa próximo bloco

3.09 Atualmente o(a) Sr.(a) fuma charutos, cigarrilhas ou cachimbos diariamente?

1. Sim

2. Não 

Passa para pergunta
4.11

3.10 Quantos charutos, cigarrilhas ou cachimbos fuma por dia? _____

3.11 Há quanto tempo parou de fumar? _____


4

CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

As próximas perguntas são sobre o consumo de bebidas alcoólicas.

4.01 Faz uso de bebidas alcoólicas?

1. Sim

2. Não 

Passar próximo bloco

4.02 Com que frequência o(a) sr.(a) bebe?

a) Todos os dias

b) 3 a 4 vezes por semana

c) Nos finais de semana

d) Raramente

4.03 Qual a quantidade?

1 copo de vinho ou 1 cerveja ou 1 dose de whisky ou cachaça

2-3 copos de vinho ou 2-3 cervejas ou 2-3 doses de whisky ou cachaça

mais de 3 copos de vinho ou 3 cervejas ou 3 dose de whisky ou cachaça

5

USO DE MEDICAMENTOS

As próximas perguntas são sobre o uso de medicamentos.

5.01 Faz uso de algum medicamento atualmente:

Medicamento

Dose

Frequência

Tempo de uso

1) _____

2) _____

3) _____

4) _____

5.02 Fez uso crônico de algum medicamento:

Medicamento

Dose

Frequência

Tempo de uso

Quando parou

1) _____

2) _____

3) _____

4) _____

5.03 Faz uso de algum fitoterápico, homeopatia, chá ou outro produto natural atualmente:

Medicamento	Dose	Freqüência	Tempo de uso
-------------	------	------------	--------------

1) _____	_____	_____	_____
----------	-------	-------	-------

2) _____	_____	_____	_____
----------	-------	-------	-------

3) _____	_____	_____	_____
----------	-------	-------	-------

4) _____	_____	_____	_____
----------	-------	-------	-------

6

DOENÇAS CRÔNICAS

6.01 Possui alguma doença crônica?

- 1. Diabetes
- 2. Pressão Alta
- 3. Insuficiência Cardíaca
- 4. Gastrite/úlcera
- 5. Tireóide
- 6. Asma/Bronquite
- 7. Febre Reumática
- 8. Outras – especifique _____

Nome: Jamila Alessandra Perini

Nascimento: 01/11/1979

Naturalidade: Joiniville-SC

➤ **Formação Acadêmica**

- Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Campos de Andrade – Curitiba/PR, março de 1999 a dezembro de 2002.
- Aperfeiçoamento em Farmacogenética pelo Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer – INCa, de janeiro de 2003 a fevereiro de 2004.
- Mestre em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, de março de 2004 a agosto de 2005.
- Doutorando em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, de agosto de 2007 a julho de 2009.

➤ **Orientação de Estudante**

1. Íris Souza Conrado de Santana - Monografia de Estágio Supervisionado de agosto 2006 a agosto 2007.
2. Fernanda Bonfim Nobre Freitas - Monitoria em Genética de agosto a dezembro de 2008.
3. Íris Souza Conrado de Santana - Iniciação Científica de setembro 2007 a abril de 2009.

➤ **Comunicações em Congresso**

- 9 comunicações em congressos nacionais

➤ **Publicações**

- Suarez-Kurtz G, **Perini JA**, Silva-Assunção E, Struchiner CJ. Relative contribution of VKORC1, CYP2C9, and INR response to warfarin stable dose. *Blood*. 2009; 113(17):4125-4126.
- Fuchshuber-Moraes M, **Perini JA**, Roskopf D, Suarez-Kurtz G. Exploring warfarin pharmacogenomics with the extreme-discordant-phenotype methodology: impact of FVII polymorphisms on stable anticoagulation with warfarin. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009.
- Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA, **Perini JA**, Silva-Assunção E, Suarez-Kurtz G (*The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*). Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data.. *New England Journal of Medicine*, 2008; 360(8):753-764.
- **Perini JA**, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana ISC, Rangel F, Ojopi EB, Dias-Neto E, Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics of warfarin: Development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2008; 84(6):722-728.
- **Perini JA**, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Suarez-Kurtz G. *VKORC1* polymorphisms in Amerindian populations of Brazil. *Pharmacogenomics*, 2008; 9(11):1623-1629.
- Suarez-Kurtz G, **Perini JA**, Bastos-Rodrigues L, Pena SDJ, Struchiner CJ. *Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism*. *Pharmacogenomics*, 2007; 8(10):1299-1306.
- **Perini JA**, Suarez-Kurtz G. Impact of CYP2C9*3/*3 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of piroxicam. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2006; 80(5):549-551.

- **Perini JA**, Vianna-Jorge R, Brogliato AR, Suarez-Kurtz G. Influence of *CYP2C9* on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of piroxicam. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 78(4):362-369.
- Suarez-Kurtz G., Vianna-Jorge R, **Perini JA**, Pena SDJ. Detection of *CYP2C9*5* in a white Brazilian subject. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 77(6):587-588.
- Vianna-Jorge R, **Perini JA**, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. *CYP2C9* genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004; 76(1):18-26.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)