

Genotipo de los genes VKORC1 y CYP2C9 en la respuesta individual a la warfarina

Dres. Patricia Esperón^{*†}, Víctor Raggio^{*}, B.C. Lucía Goyeneche[‡],
Dres. Mariana Lorenzo^{*}, Irene Taub[‡], Mario Stoll^{*}

Resumen

Introducción: la warfarina es un fármaco ampliamente utilizado como anticoagulante oral. Su estrecho rango terapéutico y marcada variabilidad interindividual en la respuesta requieren un control riguroso en su administración para evitar accidentes hemorrágicos.

Objetivos: correlacionar las variantes genéticas de CYP2C9*2 y *3 y VKORC1 (C1173T) con la respuesta y los efectos adversos.

Material y método: los genotipos CYP2C9*1, *2, *3, y VKORC1 fueron obtenidos por PCR-RFLP y los resultados analizados usando el paquete estadístico SPSS 12.0.

Resultados: hay una tendencia a la reducción de dosis en relación con la presencia de alelos polimórficos. Los portadores de CYP2C9*3 requirieron la menor dosis de mantenimiento, seguidos por los portadores de CYP2C9*2 y homocigotos CYP2C9 *1, en ese orden, ($4,4 \pm 1,0$ versus $5,4 \pm 2,3$ versus $7,0 \pm 3,6$ mg/d, $p=0,03$). Los portadores CYP2C9*3 tuvieron, además, un aumento del riesgo de sobreanticoagulación y requirieron casi el doble de ajustes de dosis para lograr una adecuada anticoagulación. Para VKORC1, los homocigotas T/T necesitaron la dosis más baja, seguidos por los heterocigotas C/T y homocigotas C/C, en ese orden ($3,6 \pm 0,6$ versus $5,5 \pm 0,5$ y $7,9 \pm 0,7$ mg/d, $p < 0,001$). Los pacientes T/T tuvieron un mayor riesgo de sobreanticoagulación que los C/T y C/C. El genotipo T/T de VKORC1 produce en todas las combinaciones con CYP2C9 una disminución cercana a 50% de la dosis diaria de warfarina.

Conclusiones: se confirma una sensibilidad aumentada a la warfarina en pacientes portadores de alelos *2 y *3 de CYP2C9, y T de VKORC1. Se demuestra un efecto combinado (aproximadamente aditivo) de los alelos variantes de ambos genes.

Palabras clave: WARFARINA - administración & dosificación.
WARFARINA - efectos adversos.
ALELOS.
GENOTIPO.
HEMORRAGIA - inducido químicamente.

Key words: WARFARIN - administration & dosage.
WARFARIN - adverse effects.
ALLELES.
GENOTYPE.
HEMORRHAGE - chemically induced.

* Área Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular (CHSCV). Uruguay.

† Cátedra de Biología Molecular. Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay.

‡ Policlínica de Anticoagulación, Departamento de Cardiología, Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

Correspondencia: Dr. G. Mario Stoll

Área Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Uruguay.

Bvar. Artigas 2358, Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: mstoll@montevideo.com.uy

Recibido: 6/11/08.

Aceptado: 8/12/08.

Introducción

La warfarina es el anticoagulante oral más utilizado en nuestro país y uno de los más usados a nivel mundial debido a su efectividad en la prevención de los accidentes tromboembólicos en los pacientes con fibrilación auricular y otras afecciones trombogénicas⁽¹⁾. Sin embargo, estos fármacos producen un aumento del riesgo de episodios hemorrágicos. La warfarina tiene un estrecho rango terapéutico y la dosis de warfarina necesaria para alcanzar los niveles esperados de anticoagulación presenta una gran variabilidad interindividual, dependiendo de factores como la alimentación y las variaciones individuales en la farmacocinética. El riesgo de sangrado es mayor durante las primeras semanas de tratamiento cuando el seguimiento mediante el índice normalizado internacional (INR), debe realizarse cuidadosamente hasta lograr el rango óptimo⁽²⁾.

Actualmente, la dosis de warfarina es determinada empíricamente, a menudo basándose en la edad y comorbilidad del paciente. La farmacogenética aplicada al tratamiento con warfarina intenta estimar la dosis individual óptima de este fármaco que logre los efectos terapéuticos y minimice los riesgos de sangrado, en función del genotipo del paciente para polimorfismos genéticos que afectan el metabolismo o los sitios de acción del fármaco.

La warfarina es un producto natural y se administra como una mezcla racémica de R y S estereoisómeros. Los enantiómeros o estereoisómeros difieren tanto en la potencia de su efecto farmacodinámico como en su forma de metabolización en fase I. Así, la S-warfarina es tres a cinco veces más potente como inhibidor de su blanco de acción: el complejo de la vitamina K epóxido reductasa. Por otra parte, el metabolismo de eliminación predominante del isómero S es a través de CYP2C9 mientras que el metabolismo de R-warfarina se debe principalmente a través de CYP3A4 con la participación de CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19.

Actualmente se conocen los principales determinantes genéticos de la variabilidad en la respuesta a la warfarina⁽³⁻⁵⁾. Es ampliamente conocido que el gene que codifica la hidroxilasa, dependiente del citocromo P-450, CYP2C9 (19q24), es el principal metabolizador de la S-warfarina. La farmacocinética de la warfarina y de CYP2C9 es considerada como un ejemplo clásico de la farmacogenética. Los dos más importantes variantes con implicaciones clínicas para establecer la dosis de warfarina y la prevención de eventos adversos son CYP2C9*2 (R144C) y CYP2C9*3 (I359L). Los individuos con las variantes *2 y *3 tienen más probabilidades de necesitar dosis más bajas de warfarina ("metabolizadores lentos"), tardan más en llegar a un INR adecuado al inicio del tratamiento y tienen un mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas⁽⁶⁾.

Previamente nuestro grupo publicó un caso de hipersensibilidad a la warfarina producido por variantes de CYP2C9⁽⁷⁾ y el primer análisis en una población de Uruguay donde se analizó la asociación entre el efecto de las variantes de CYP2C9 y la dosis de mantenimiento con el riesgo de efectos adversos durante el tratamiento crónico con warfarina⁽⁸⁾.

Más recientemente, se ha visto que el gene de la subunidad 1 del complejo de la vitamina K epóxido reductasa, VKORC1 (16p11.2), presenta polimorfismos que modulan la dosis diaria de warfarina requerida⁽⁹⁾. En particular, se ha reportado que el polimorfismo de VKORC1 C1173T es uno de los que afecta la dosis de warfarina: 3,7 mg/d entre pacientes con el genotipo T/T, 5,1 mg/d en los heterocigotos C/T y 7,0 mg/d en los homocigotos C/C⁽¹⁰⁾.

En este trabajo analizamos el efecto de las variantes ya estudiadas de CYP2C9 (alelos *1, *2 y *3) en combinación con la variante (C1173T) de VKORC1, sobre los requerimientos de warfarina (dosis diaria) y el riesgo de efectos adversos (sobreanticoagulación y sangrados) en una población de pacientes en anticoagulación crónica con warfarina de nuestro medio.

Material y método

Pacientes

Se incluyeron 68 pacientes en régimen de anticoagulación crónica. Estos pacientes fueron reclutados por dos vías: 1) pacientes controlados en la Policlínica de Anticoagulación del Servicio de Cardiología del Hospital de Clínicas (grupo estudiado en la publicación anteriormente citada), y 2) pacientes que consultaron en la Policlínica de Genética Cardiovascular.

Se obtuvieron datos del seguimiento de cada paciente considerando las variables: sexo, edad, indicación de anticoagulación y tabaquismo. Se tomó la dosis diaria de mantenimiento de warfarina indicada y se consideró como una dosis alta: 8 mg/día. Ello surge de la media más un desvío estándar de la mejor estimación que disponemos de la dosis que se administra en la Policlínica de Anticoagulación del Hospital de Clínicas⁽¹¹⁾. Se consideraron variables clínicas indicadoras de la respuesta farmacocinética: valores mínimo y máximo de INR, cantidad de ajustes de dosis necesarios, cantidad de INR por encima y por debajo del rango objetivo. Éstos se analizaron en relación con la cantidad de controles realizados. Se registraron los eventos adversos considerando como tales: el aumento de INR por encima de 6 (sobreanticoagulación), y la ocurrencia de sangrados de cualquier entidad. Se consideraron sangrados mayores a los intracraneales, los oculares y aquellos que requirieron transfusión o internación. La indicación de anticoagulación se clasificó en: 1) prótesis valvu-

lar, aunque tuviera otra indicación; 2) fibrilación auricular, aunque hubiera sufrido un evento tromboembólico; 3) trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar, o ambos; 4) síndromes protrombóticos, y 5) otros, que incluye accidente cerebrovascular.

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas. En todos los casos se obtuvo consentimiento informado.

Diagnósticos moleculares

A partir de una muestra de sangre periférica (3 ml) se extrae ácido desoxirribonucleico (ADN) del paciente mediante el uso de kit comercial de purificación de ADN genómico. El genotipo de los pacientes para las variantes *1, *2 y *3 del gene *CYP2C9* fue realizado utilizando kits diagnósticos comerciales (ATGen Sistemas Moleculares-Celsius, Uruguay). El genotipo de *VKORC1* (variante C1173T) se analizó por técnicas de PCR-RFLP. Los cebadores directo y reverso utilizados fueron:

5'-AGATAAAGCAGGGCCTAACG-3' y

5'-CCGAGAAAGGTGATTTCCA-3', respectivamente.

Las condiciones de ciclado térmico: una desnaturalización de 3 min. a 95°C, 30 ciclos que incluyen 30.s a 95°C, 30.s a 55°C y 30 s a 72°C; y una extensión final de 3 min. a 72°C. El producto de la digestión se analiza en gel de acrilamida (figura 1).

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media la desviación estándar (DS). Las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos fueron evaluadas mediante la prueba t de Student y entre más de dos grupos usando ANOVA (SPSS 12.0), según correspondía. Para la evaluación de las desviaciones de frecuencias de los alelos del equilibrio de Hardy-Weinberg, hemos utilizado la prueba de χ^2 .

Se utilizó un análisis gradual de regresión múltiple para determinar los efectos relativos de los polimorfismos en los genes estudiados sobre la sensibilidad frente a la warfarina.

Para evaluar las diferencias en cuanto a dosis durante el primer período de estabilidad y el porcentaje de variabilidad explicada por los genotipos de *VKORC1* y *CYP2C9*, hemos utilizado modelos de regresión lineal.

Para las comparaciones entre los genotipos, los pacientes fueron divididos en tres categorías para los dos genotipos de *CYP2C9* y *VKORC1*. Para el genotipo *CYP2C9*, los homocigotos portadores del alelo tipo silvestre (*CYP2C9**1/*1) formaron el grupo de referencia, y los otros dos grupos eran los portadores de los alelos *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3.

Para el genotipo *VKORC1* C1173T, los homocigotos portadores del alelo de *VKORC1* de tipo silvestre (*VKORC1*

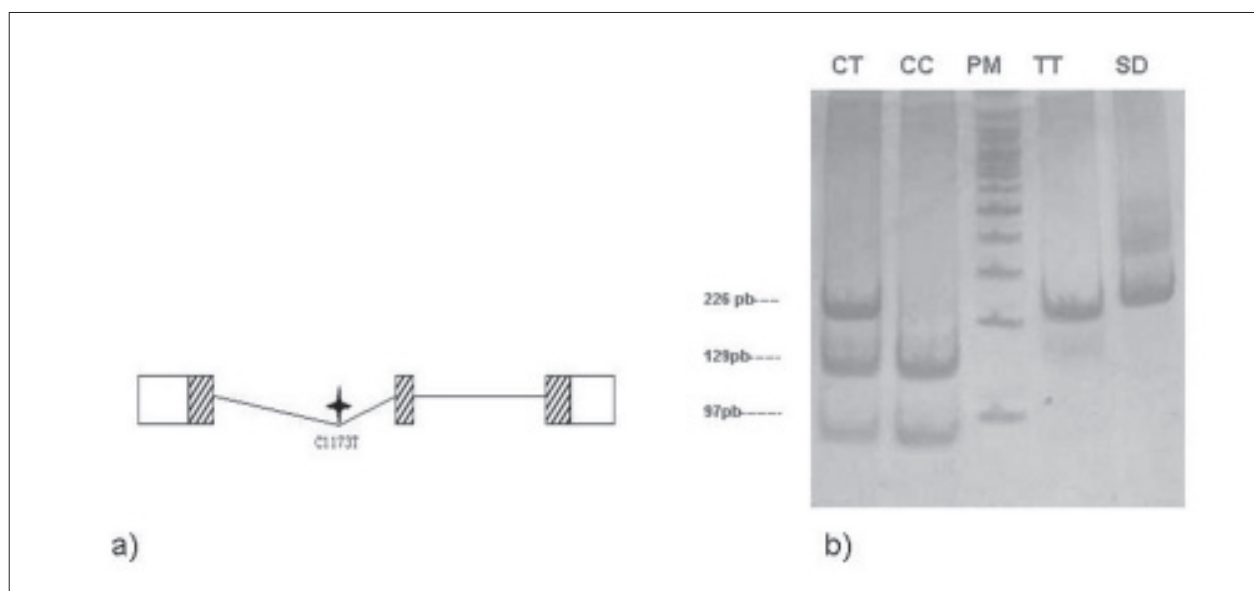


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del gene *VKORC1* y su análisis por PCR-RFLP. **a.** Los exones se indican en rectángulos con rayas y los intrones mediante líneas. Los rectángulos sin colorear indican las regiones no transcritas (5'UTR y 3'UTR). La estrella indica la ubicación del polimorfismo simple analizado en este trabajo. **b.** Electroforesis en gel de acrilamida a 6% de los productos de PCR-RFLP. Se observan los distintos patrones de bandas correspondientes a los tres genotipos posibles para el polimorfismo de *VKORC1* C1173T, junto a un marcador de peso molecular (PM) y el producto de PCR sin digerir (SD). A la izquierda se indica mediante número los tamaños de los distintos fragmentos obtenidos

C/C) formaron el grupo de referencia, los otros dos grupos consistían en pacientes con los genotipos VKORC1 C/T y T/T. Un “p value” inferior a 0,05 se consideró como el nivel mínimo de significación estadística.

Resultados

En la tabla 1 se muestran las características de los pacientes estudiados con relación a genotipo de CYP2C9 y VKORC1. No hubo diferencias significativas entre los genotipos en relación a edad, sexo, tabaquismo e indicación de la anticoagulación.

De los 68 pacientes, 45 presentaban por lo menos un alelo variante en VKORC1 (23% fueron T/T y 44% fueron C/T) y 33 presentaban un alelo variante en CYP2C9 (17 presentaban un alelo *2, 14 un alelo *3 y dos pacientes presentaban dos alelos *3). Las frecuencias alélicas para ambos polimorfismos se muestran en la figura 2.

Si bien la distribución de genotipos de VKORC1 es concordante con datos de otras poblaciones⁽¹²⁾, encontramos que las distribuciones genotípicas de los distintos polimorfismos de CYP2C9 (51% CYP2C9*1*1, 25% CYP2C9*1*2, 21% CYP2C9*1*3 y 3% CYP2C9*3*3) son diferentes a las reportadas tanto en Uruguay⁽¹³⁾ como para otras poblaciones⁽¹⁴⁾. Es de destacar el alto porcentaje de

CYP2C9*3*3 y la ausencia de CYP2C9*2*2 homocigotas. Los porcentajes encontrados en nuestra población podrían explicarse debido a un sesgo en la elección de pacientes, favoreciendo la incorporación de aquellos en los que lograr una dosis de mantenimiento fue más difícil. En este sentido, se ha reportado^(15,16) que el tiempo necesario para lograr una estabilización de la dosis está asociado con el genotipo CYP2C9 y no con un genotipo VKORC1. En los portadores de por lo menos un alelo *3 se logra, con menos eficacia, una estabilidad en la dosis al compararlos con los pacientes *1 o *2. Como el hecho de poseer el polimorfismo de VKORC1 se asocia marcadamente con la necesidad de una menor dosis, un ajuste de dosis en menos en los portadores va a lograr una estabilización del INR con una dosis menor comparada con el ajuste de dosis en los portadores de polimorfismos de CYP2C9. Esto resultará en una estabilización más rápida con una dosis menor.

Los portadores del alelo CYP2C9*3 requirieron la menor dosis de mantenimiento, seguido por los portadores del alelo *2 y, por último, los individuos homocigotos para CYP2C9*1 ($4,4 \pm 1,0$ versus $5,4 \pm 2,3$ versus $7,0 \pm 3,6$ mg/d, $p=0,03$) (tabla 2). Ninguno de los portadores de alelo CYP2C9*3 recibió dosis de mantenimiento mayores a 8 mg/d como sucedió con 13% de los portadores de *2 y

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio

	CYP2C9				VKORC1		
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*3/*3	C/C	C/T	T/T
n (%)	36 (50,7)	17 (23,9)	16 (22,5)	2 (2,8)	23 (33,8)	30 (44,1)	15 (22,1)
Edad	62,1	55,4	48,6	52,5	55,0	62,4	52,6
Sexo (% M)	36,1	64,7	31,3	100,0	43,5	46,7	46,7
Tabaquismo	12,5	18,8	23,1	0,0	9,5	16,7	30,0
Indicación (%)							
PV	37,5	52,9	12,5	0,0	50,0	30,0	25,0
FA	37,5	17,6	25,0	50,0	22,7	33,3	33,3
TVP/TEP	12,5	11,8	18,8	0,0	9,1	16,7	16,7
S. protrombótico	3,1	0,0	18,8	0,0	4,5	10,0	8,3
Otros	9,4	17,6	25,0	50,0	13,6	10,0	16,7
INR objetivo (%)							
2,0-3,0	68,8	43,8	50,0	50,0	47,6	63,3	60,0
2,5-3,5	31,3	56,3	50,0	50,0	52,4	36,7	40,0

PV: prótesis valvular; FA: fibrilación auricular; TVP/TEP: trombosis venosa profunda y/o tromboembolismo pulmonar; S. protrombótico: síndrome protrombótico

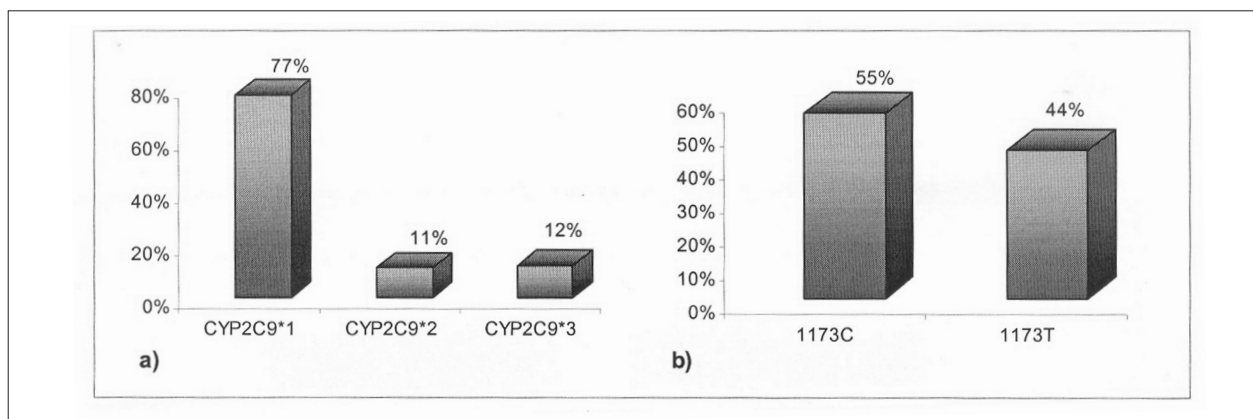


Figura 2. Frecuencias alélicas en la población para los genes CYP2C9 (a) y VKORC1 (b)

Tabla 2. Distribución de la dosis de mantenimiento diaria de warfarina, riesgo de sobreanticoagulación y sangrado respecto a los genotipos de CYP2C9 y VKORC1

	CYP2C9				VKORC1		
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*3/*3	CC	CT	TT
n	35	17	14	2	23	30	15
Dosis diaria	7,0 +/- 3,6	5,4 +/- 2,3	4,4 +/- 1,0	1,25	7,9 +/- 0,7	5,5 +/- 0,5	3,6 +/- 0,6
Sangrado (%)	62%	47%	67%	100%	50%	63%	60%
Sobreanticoagulación (%)	6%	7%	17%	100%	50%	7%	40%

39% de los homocigotas *1 ($p=0,010$).

En cuanto a los genotipos de VKORC1, los homocigotas T/T necesitaron la dosis más baja, seguidos por los portadores C/T y, por último, los homocigotas C/C ($3,6 \pm 0,6$ versus $5,5 \pm 0,5$ y $7,9 \pm 0,7$ mg/d, $p < 0,001$) (tabla 2). Los pacientes T/T no necesitaron una dosis de mantenimiento superior a 7,5 mg/d, mientras que para los portadores del genotipo C/T la dosis de mantenimiento fue de hasta 12,5 mg/d y para los C/C tan alta como 16,4 mg/d.

Los portadores del alelo CYP2C9*3 tuvieron un aumento del riesgo de sobreanticoagulación con respecto a los portadores de los alelos *2 o *1, tomados en conjunto (28,6% versus 6,5% $p=0,024$). También requirieron casi el doble de ajustes de dosis para lograr una adecuada anticoagulación, en comparación con los homocigotas CYP2C9*1.

Para las variantes de VKORC1 no se aprecian diferencias significativas en el número de ajustes de dosis (C/T: 3,5 versus C/C: 3,8 versus T/T: 3,2). Se observó que los pacientes T/T tuvieron mayor riesgo de sobreanticoagu-

lación que los C/T y C/C (40% versus 7% versus 5%, $p=0,008$).

Si bien las diferencias no son significativas, se observó una tendencia a un mayor número de sangrados entre los portadores de alelos variantes de CYP2C9 (especialmente el alelo *3) y VKORC1 (tabla 2), lo que coincide con lo ya reportado⁽¹⁷⁾. Sin embargo, los tres episodios de sangrado mayor en esta población se produjeron en pacientes portadores de alelos variantes de CYP2C9 o VKORC1, o ambas.

Se analizó el efecto de las posibles combinaciones de genotipos para estos dos polimorfismos, considerando tanto el número de alelos variantes (figura 3) como los distintos genotipos observados (figura 4).

Se aprecia una clara tendencia a la disminución de la dosis en la medida que se suman alelos variantes en estos dos genes (figura 3a), así como una variación de hasta 67,8% en más o 32,5% en menos, de una hipotética dosis de inicio de 5 mg/d, según el número de alelos variantes (figura 3b). Los riesgos de sangrado y sobreanticoagula-

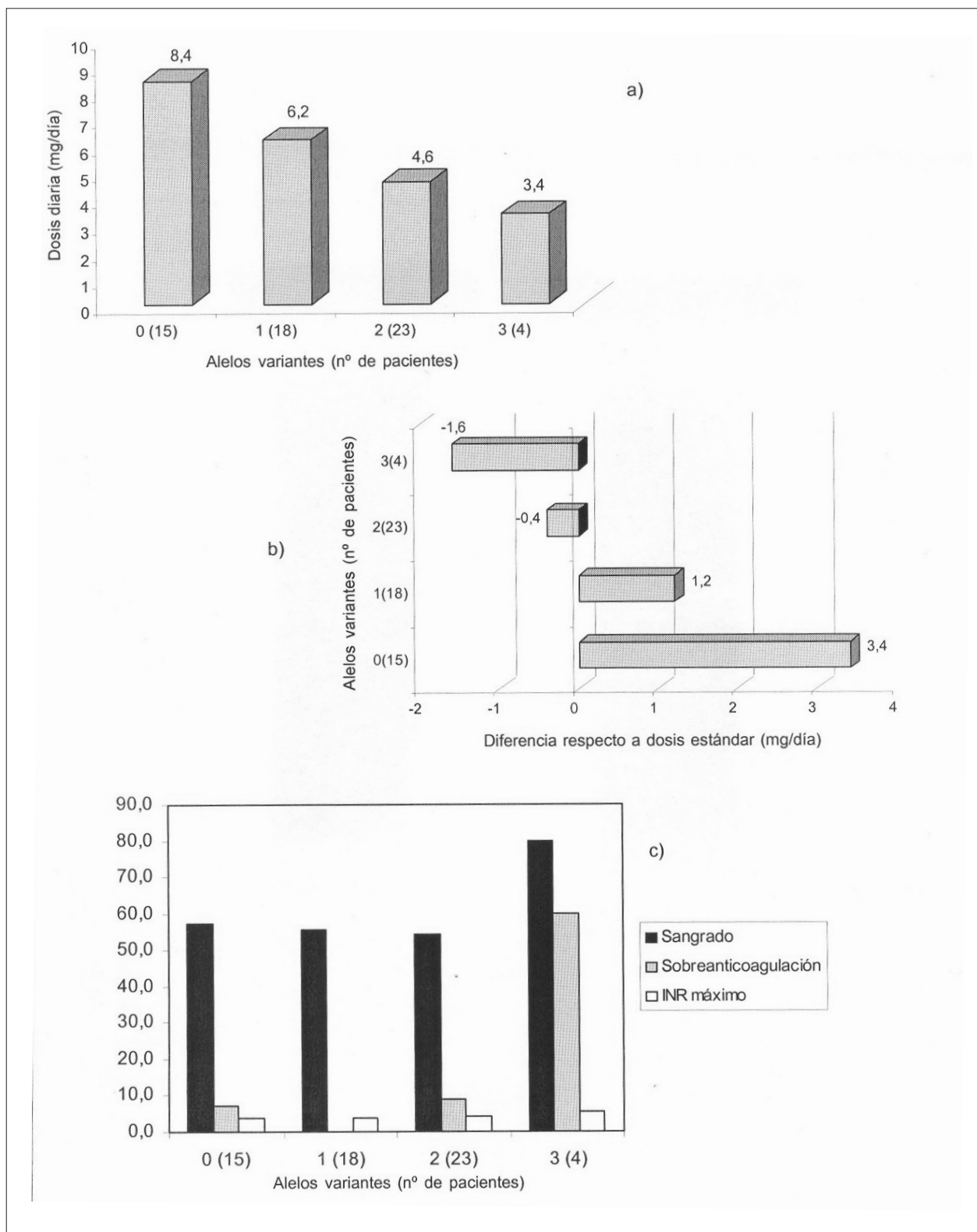


Figura 3. Efecto acumulativo de las variantes de CYP2C9 y VKORC1. **a)** Según la dosis de mantenimiento diaria de warfarina y una dosis estándar de 5 mg/d. **b)** Respecto a una dosis estándar de 5 mg/d. Se grafica la diferencia entre dosis estándar y dosis suministrada. **c)** Respecto a riesgo de sobreanticoagulación, riesgo de sangrado e índice normalizado internacional (INR) máximo registrado. Número de alelos variantes se refiere al número de alelos *2 y/o *3 (CYP2C9) y alelos T (VKORC1) presentes en el genoma del paciente

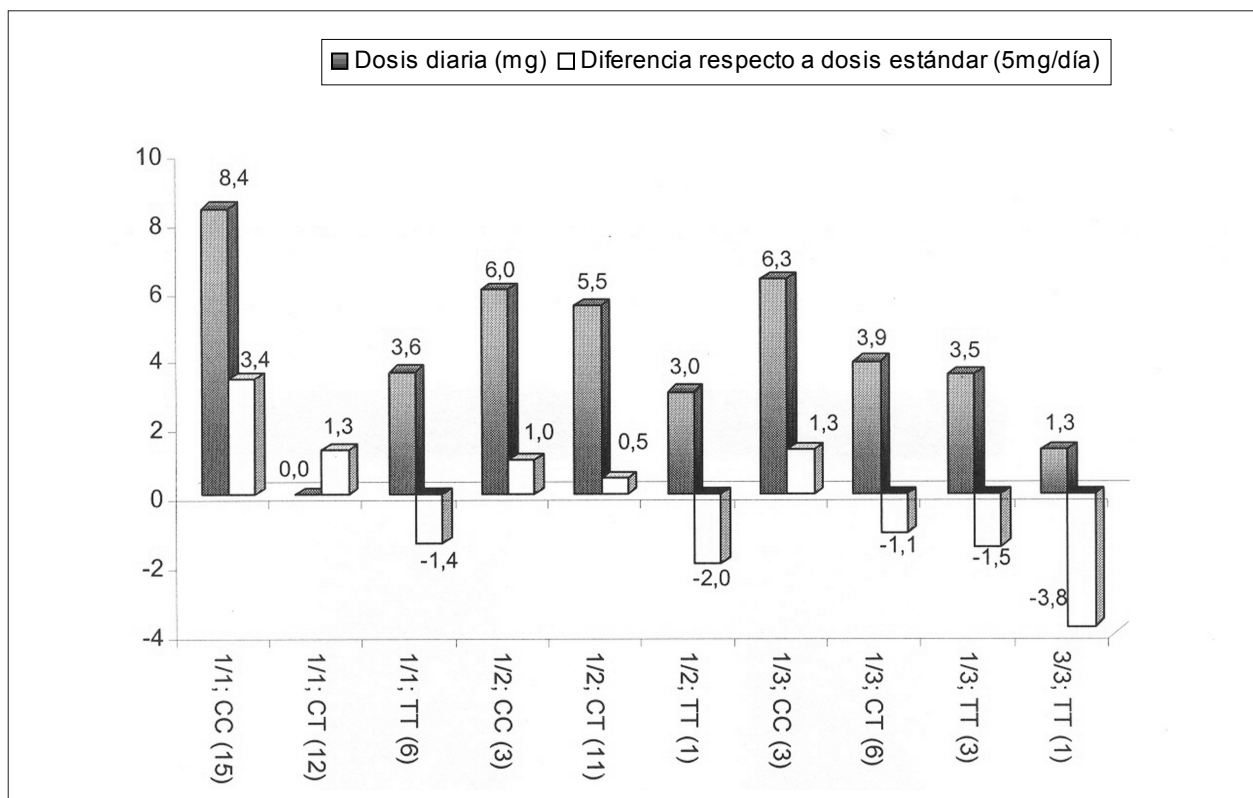


Figura 4. Efecto de las combinaciones de genotipos de CYP2C9 y VKORC1 sobre la dosis de mantenimiento diaria de warfarina. Se indica mediante barras claras la dosis diaria y en barras oscuras la diferencia entre esta y una dosis estándar de 5 mg/d. Nota: 1, 2 o 3 se refiere al genotipo de CYP2C9 y C o T al genotipo de VKORC1. Entre paréntesis se muestra el número de individuos con cada genotipo. En esta población no aparecen todas las posibles combinaciones de genotipos

ción se disparan en el grupo con tres alelos variantes, si bien estos son sólo cuatro individuos (figura 3c).

El efecto de sumatoria de los alelos variantes de CYP2C9 y VKORC1 se aprecia también analizando genotipos específicos. El genotipo TT de VKORC1 produce en todas las combinaciones con CYP2C9 una disminución cercana a 50% de la dosis diaria de warfarina. Además, se observa claramente el efecto de dosis génica tanto de alelos T de VKORC1 como de alelos *2 y *3 de CYP2C9 (figura 4).

Discusión

Un número creciente de pacientes están siendo tratados con warfarina y otros anticoagulantes orales. Sin embargo, su manejo clínico presenta algunos problemas y, en algunos casos, los riesgos del tratamiento pueden superar al beneficio obtenido. El lograr una mejor comprensión de los factores genéticos que ayudan a determinar más acertadamente la dosis individual y la respuesta a los anticoagulantes debería ayudar al tratamiento, en particular durante el periodo de inducción.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman los hallazgos descritos en la bibliografía sobre la influencia de estos dos genes sobre la respuesta a la warfarina^(18,19). La dosis de mantenimiento, aspecto más fuertemente influido por estas variantes, muestra una fuerte asociación con las variantes genéticas analizadas en CYP2C9 y VKORC1. En la mayoría de las variables analizadas se aprecia un claro efecto de dosis génica de estas variantes sobre el fenotipo.

Hemos encontrado que el polimorfismo C1173T de VKORC1 presentó una mayor asociación con la dosis de warfarina que los polimorfismos CYP2C9 ($p < 0,001$ versus $p < 0,030$). Una mayor parte de la variación en la dosis diaria se explica por el genotipo VKORC1 que por el genotipo CYP2C9 (24% y 12%, respectivamente), y juntos explican 34% de la variabilidad de la dosis en esta población, lo que está en concordancia con lo reportado previamente⁽²⁰⁾.

Por otro lado, los hallazgos son concordantes con la fisiopatología molecular de estas variantes genéticas: los productos del alelo *2 y *3 de CYP2C9 tienen una menor actividad enzimática (hidroxilación de la S-warfarina)^(21,22), con lo que eliminan más lentamente la warfarina, por lo

que, en general, estos pacientes requieren dosis significativamente menores de warfarina para alcanzar los valores de INR deseados. Se ha estimado que la variante *3 tiene una eficiencia de 5% y la *2 de 12% respecto del alelo normal con relación al metabolismo de la warfarina⁽²³⁾. La variante T de VKORC1 se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con otra variante, G-1639A, en el promotor del mismo gene⁽¹⁶⁾, observándose que el alelo G se asocia con un estado de la cromatina activa lo, que favorece la expresión del gene⁽²⁴⁾. Además, se ha demostrado que el promotor de VKORC1 con el alelo G tiene 44% más de actividad in vitro que cuando está presente el alelo A⁽²⁵⁾. Por lo tanto, el alelo T podría estar asociado a una menor actividad del gene y una menor producción de la proteína, lo que potenciaría el efecto de la warfarina.

El objetivo de la terapia basada en la farmacogenética de los cumarínicos ha sido disminuir la toxicidad, mejorando la seguridad y la eficacia del tratamiento anticoagulante. Los mayores riesgos determinados por estas variantes genéticas se dan durante la fase de inducción de la anticoagulación. Estudios recientes que analizaron en forma prospectiva el impacto de las variantes *2 y *3 de CYP2C9, muestran que el riesgo de tener al menos un INR por encima del rango aumentaba entre tres y seis veces en la primera semana de tratamiento sumado a que los controles fuera de rango son un factor de riesgo de sangrado independiente⁽²⁶⁾. El impacto de las variantes genéticas no se observaba a la tercera semana, presumiblemente como resultado de una exitosa individualización empírica de la dosis⁽²⁷⁾.

Años atrás se comenzaron a realizar estudios prospectivos para valorar la utilidad de determinar el genotipo para las variantes de CYP2C9 de los pacientes previo al inicio de la anticoagulación oral, con resultados preliminares que indican la factibilidad y eficacia de este encare^(28,29). Más recientemente se desarrollaron algoritmos de dosificación basados en el genotipo de CYP2C9 y VKORC1, y características clínicas de los pacientes como sexo, edad y tamaño corporal⁽³⁰⁻³³⁾, y se comenzaron a utilizar en estudios prospectivos con buenos resultados⁽³⁴⁾. Sin embargo, ninguno ha sido ampliamente aceptado, ya que no dan cuenta de toda la varianza en la dosis de warfarina y que la mayoría fue desarrollada para pacientes de edad media y con un seguimiento estricto del INR.

La sensibilidad a la warfarina es un rasgo multifactorial que depende de factores no genómicos como la edad, el índice de masa corporal, la disponibilidad de vitamina K, la nutrición y el uso concomitante de otros fármacos. Otros genes están asociados con las dosis requeridas de warfarina: *PROC* (rs2069919), *EPHX1* (rs4653436), *GGCX* (rs12714145), y *ORM1* (rs1687390)⁽³⁵⁾. Recientemente, se ha descrito que los polimorfismos del gene *CYP4F2* también podrían afectar la respuesta a la warfarina⁽³⁶⁾. Sin

embargo, estudios realizados analizando todo el genoma, buscando variantes que influyeran en este rasgo, muestran que es poco probable que se encuentren otros polimorfismos fuera de los genes *CYP2C9* y *VKORC1* con importantes efectos sobre la dosis de warfarina⁽³⁷⁾.

Conclusiones

Este estudio confirma una sensibilidad aumentada a la warfarina en pacientes de nuestra población portadores de los alelos de CYP2C9*2 y *3, y de VKORC1 1173T. Estos resultados están en concordancia con lo reportado a nivel internacional. Además, se demuestra el efecto combinado (aproximadamente aditivo) de los alelos variantes de ambos genes.

Actualmente, la determinación de genotipos es generalmente realizada en laboratorios especializados y en el marco de programas de investigación. La mayoría de los resultados son consistentes y con alto valor predictivo (al menos en cuanto a la dosis diaria), lo que hace probable su utilización a nivel clínico en el manejo de los pacientes que inician tratamiento con warfarina⁽³⁸⁾. En agosto de 2007, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) cambió el texto del prospecto que acompaña a la warfarina. En esta nueva versión se resalta la oportunidad del uso de test genéticos para mejorar la estimación del cálculo inicial para lograr una dosis razonable para cada paciente. También menciona que existen algoritmos disponibles, aunque no sugiere el uso de ninguno de ellos⁽³⁹⁾.

Si bien la determinación de los genotipos de CYP2C9 y VKORC1 antes del inicio del tratamiento está en plena discusión, parece lógico realizarlo en pacientes seleccionados. Proponemos, entonces, como una aplicación clínica de la farmacogenética en un programa preventivo, que la indicación de caracterización genotípica debe considerarse a la hora de establecer la mejor dosis individual en pacientes en quienes se sospecha alto riesgo de sangrado o sobreanticoagulación:

- Pacientes de edad avanzada con comorbilidades y/o en tratamiento crónico con fármacos inhibidores de CYP2C9 (amiodarona, inhibidores de la recaptación de serotonina, fibratos, omeprazol, etcétera), o con antecedentes de efectos adversos⁽⁴⁰⁾.
- Pacientes que sufrieron un efecto negativo con el tratamiento previo con warfarina, ya sea dificultad extrema en lograr estabilización del INR, o aumentos bruscos del mismo (por encima de 6) sin mediar otras interacciones farmacológicas o nutricionales, y sangrados.
- Individuos jóvenes que potencialmente se enfrentarán a un tratamiento anticoagulante oral prolongado.
- Familiares de pacientes previamente diagnosticados con hipersensibilidad a la warfarina.

Agradecimiento

Al Dr. Juan José Goyeneche, profesor de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas, por su colaboración en el análisis estadístico de los datos.

Summary

Introduction: warfarin is a widely used oral anticoagulant. Its narrow therapeutic range (NTR) and its large interindividual variability requires strict control when administered to avoid hemorrhagic accidents.

Objectives: to correlate CYP2C9*2 and *3 and VKORC1 (C1173T) genetic variants with response and adverse side effects.

Method: CYP2C9*1, *2, *3, and VKORC1 genotypes were obtained by a commonly used PCR-RFLP procedure. The results were analyzed using SPSS 12.0. statistical package.

Results: there is a tendency to reduce the dosage in connection with the presence of polymorphic alleles. CYP2C9*3 carriers require the lower maintenance dosage, followed by CYP2C9*2 carriers and then by CYP2C9 *1 homozygotes (4.4 ± 1.0 versus 5.4 ± 2.3 versus 7.0 ± 3.6 mg/d, $p=0.03$). CYP2C9*3 carriers also showed an increase in the anticoagulation risk, which required almost twice the number of dose adjustments to achieve appropriate anticoagulation. As to VKORC1, T/T homozygotes needed the lowest dose, followed by the C/T heterozygotes, and then by the C/C homozygotes (3.6 ± 0.6 versus 5.5 ± 0.5 and 7.9 ± 0.7 mg/d, $p<0.001$). Risk of overcoagulation was higher in T/T patients than in C/T or C/C patients. T/T genotype of VKORC1 causes a decrease of nearly 50% in the warfarine daily dosage for all combinations with CYP2C9.

Conclusions: we confirmed an increased sensitivity to warfarine in patient carriers of *2 and *3 CYP2C9 alleles and T VKORC1 alleles. We showed a combined effect (approximately accumulative) of variant alleles in both genes.

Résumé

Introduction: la warfarine est une drogue très utilisée comme anticoagulant oral. Étant donné son restreint rang thérapeutique et sa remarquable variabilité interindividuelle, un contrôle rigoureux du dosage s'avère indispensable afin d'éviter des accidents hémorragiques.

Objectifs: mettre en rapport les variantes génétiques de CYP2C9*2 et *3 et VKORC1 (C1173T) avec la réponse et les effets adverses.

Matériel et méthode: les génotypes CYP2C9*1, *2, *3, et VKORC1 résultent par PCR-RFLP et les résultats analysés au moyen du paquet statistique SPSS 12.0.

Résultats: il existe une tendance à réduire la dose par

la présence d'allèles polymorphiques. Les porteurs de CYP2C9*3 ont requis une dose plus basse de maintien, puis les porteurs de CYP2C9*2 et homozygotes CYP2C9*1, dans cet ordre, ($4,4 \pm 1,0$ versus $7,0 \pm 3,6$ mg/d, $p=0,03$). Les porteurs CYP2C9*3 ont aussi subi une augmentation du risque de suranticoagulation et ont requis presque le double d'ajustement de la dose pour atteindre une anticoagulation adéquate. Pour VKORC1, les homozygotes T/T ont requis une dose plus basse, suivis des hétérozygotes C/T et des homozygotes C/C, dans cet ordre ($3,6 \pm 0,6$ versus $5,5 \pm 0,5$ et $7,9 \pm 0,7$ mg/d, $p<0,001$). Les patients T/T ont subi un plus grand risque de suranticoagulation que les C/T et C/C. Le génotype T/T de VKORC1 provoque dans toutes les combinaisons avec CYP2C9 une diminution de 50% environ de la dose par jour de warfarine.

Conclusions: on confirme une sensibilité augmentée à la warfarine chez les patients porteurs d'allèles *2 et *3 de CYP2C9, et T de VKORC1. Un effet combiné (à peu près aditif) des allèles variantes des deux gènes reste évident.

Resumo

Introdução: a warfarina é uma droga muito usada como anticoagulante oral. Sua administração deve ser controlada rigorosamente para evitar acidentes hemorrágicos devido a uma aplicação terapêutica restrita e a variação da resposta individual.

Objetivos: correlacionar as variantes genéticas de CYP2C9*2 e *3 y VKORC1 (C1173T) com a resposta e os efeitos adversos.

Material e método: os genótipos CYP2C9*1, *2, *3, e VKORC1 foram obtidos por PCR-RFLP e os resultados foram analisados usando o programa SPSS 12.0.

Resultados: observa-se uma tendência à redução da dose na presença de alelos polimórficos. Os portadores de CYP2C9*3 necessitam doses de manutenção mais baixas, seguidos pelos portadores de CYP2C9*2 e homozigotos CYP2C9 *1 ($4,4 \pm 1,0$ versus $5,4 \pm 2,3$ versus $7,0 \pm 3,6$ mg/d, $p=0,03$). Os portadores de CYP2C9*3 apresentaram também um aumento do risco de sobreanticoagulação e necessitam o dobro do número de ajustes de dose para obter uma anticoagulação adequada. Para VKORC1, os homozigotos T/T necessitaram a dose mais baixa, seguidos pelos heterozigotos C/T e homozigotos C/C ($3,6 \pm 0,6$ versus $5,5 \pm 0,5$ y $7,9 \pm 0,7$ mg/d, $p<0,001$). Os pacientes T/T apresentaram um risco maior de sobreanticoagulação que os C/T e C/C. O genótipo T/T de VKORC1 produz uma redução de aproximadamente 50% da dose diária de warfarina em todas as combinações com CYP2C9.

Conclusões: confirma-se a sensibilidade aumentada à warfarina de pacientes portadores de alelos *2 y *3 de

CYP2C9, e T de VKORC1. Demonstram-se um efeito combinado (aproximadamente aditivo) dos alelos variantes de ambos os genes.

Bibliografía

- Go AS, Hylek EM, Chang Y, Phillips KA, Henault LE, Capra AM, et al. Anticoagulation therapy for stroke prevention in atrial fibrillation: how well do randomized trials translate into clinical practice? *JAMA* 2003; 290(20): 2685-92.
- Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 2001; 119: 8S-21S.
- Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348: 529-37.
- Evans WE, Relling M. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-91.
- Rettie AE, Tai G. The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv* 2006; 6: 223-7.
- Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: A HuGenet™ systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005; 7(2): 97-104.
- Raggio V, Neira P, Esperón P, Lorenzo M, Stoll M. Respuesta terapéutica inadecuada a la warfarina en un paciente genéticamente susceptible. *Rev Med Urug* 2005; 21: 242-6.
- Raggio V, Esperón P, Lorenzo M, Taub I, Cuesta A, Rodríguez A, et al. Variantes de los genes CYP2C9 y apolipoproteína E en la respuesta individual a la warfarina. *Rev Urug Cardiol* 2006; 21: 104-16.
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352(22): 2285-93.
- D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105(2): 645-9.
- XXI Congreso Uruguayo de Cardiología: temas libres. *Rev Urug Cardiol* 2005; 20(3): 199. Obtenido de: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0797-00482005000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es (Consulta: 20 oct 2008).
- Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1. Rationale and perspectives. *Thrombosis Research* 2007; 120: 1-10.
- Estrada N, Sevrini I, Prego A, Giusti M, Azambuja C, Álvarez Rocha A. Prevalencia de los polimorfismos del CYP2C9 en una población uruguaya anticoagulada con warfarina. *Tendencias* 2006; 73-7.
- Scordo MG, Akillu 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(4): 447-50.
- Schalekamp T, Brassé BP, Roijers JF, Chahid Y, van Geest-Daelderop JH, de Vries-Goldschmeding H, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(1): 13-22.
- Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Fye-Anderson A, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 358: 999-1008.
- Limdi NA, McGwin G, Goldstein JA, Beasley TM, Arnett DK, Adler BK, 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* 2008; 83(2): 312-21.
- Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2008. (Epub ahead of print).
- Meckley LM, Wittkowsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients. *Thromb Haemost* 2008; 100(2): 229-39.
- Haug KB, Sharikabad MN, Kringen MK, Narum S, Sjaatil ST, Johansen PW, et al. Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction. *Thromb J* 2008; 6: 7.
- Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 203-10.
- Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 447-58.
- Aithal GP, Day CP, Kesteven P, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1998; 353: 717-9.
- 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(4): 1013-21.
- Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charnig MJ, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; 14(13): 1745-51.
- Casais P, Sánchez Lucero A, Meschengieser S, Fondevila C, Santarelli M, Lazzari M. Bleeding risk factors in chronic oral anticoagulation with acenocoumarol. *Am J Hematol* 2000; 63: 192-6.
- 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(5): 540-50.
- Voora D, Eby C, Linder MW, Milligan PE, Bukaveckas BL, McLeod HL, et al. Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2 C9 genotype. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 700-5.
- Hillman M, Wilke RA, Yale SH, Vidaillet HJ, Caldwell MD, Glurich I, et al. A prospective, randomized pilot trial of model-based warfarin dose initiation using CYP2C9 genotype and clinical data. *Clin Med Res* 2005; 3(3): 137-45.
- Sconce EA, Khan T, Wynne H, Avery P, Monkhouse L, King B, 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: 2329-33.

31. **Gage BF, Lesko LJ.** Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 25(1): 45-51.
32. **Washington University Medical Center. Barnes-Jewish Hospital.** Warfarin dosing. 2008. Obtenido de: www.warfarindosing.org (Consulta: 20 oct 2008).
33. **Perini J, Struchiner C, Silva-Assunção E, Santana I, Rangel F, Ojopi E, et al.** Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 722-8.
34. **Wen MS, Lee M, Chen JJ, Chuang HP, Lu LS, Chen CH, et al.** Prospective study of warfarin dosage requirements based on *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84(1): 83-9.
35. **Wadelius M, Pirmohamed M.** Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J* 2006; 7: 99-111.
36. **Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al.** *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 2008; 111(8): 4106-12.
37. **Cooper GM, Johnson JA, Langae TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, et al.** A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood* 2008; 112(4): 1022-7.
38. **Lesko LJ.** The critical path of warfarin dosing: finding an optimal dosing strategy using pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84(3): 301-3.
39. **U.S. Food and Drug Administration.** FDA Approves updated warfarin (coumadin) prescribing information. *FDA News* 2007. Obtenido de: www.fda.gov/bbs/topics/news/2007/new01684.html (Consulta: 20 oct 2008).
40. **Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, et al.** Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1095-106.