

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Influência de polimorfismos nos genes PROC e F7 na dose
terapêutica da varfarina**

TACIANE BORSATTO

Porto Alegre, julho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

Influência de polimorfismos nos genes PROC e F7 na dose
terapêutica da varfarina

TACIANE BORSATTO

Dra. Eliane Bandinelli
Orientadora

Msc. Mariana Rodrigues Botton
Co-orientadora

Porto Alegre, julho de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, como recompensa aos esforços dedicados à minha formação, como reconhecimento do incentivo e conforto oferecidos quando precisei, e como gratidão por me desafiarem e acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Eliane Bandinelli, por ter me ajudado com carinho, pela atenção e tempo dedicados a me ensinar ciência como prática e questionamento.

À minha co-orientadora, Mariana Rodrigues Botton, por ter me acompanhado incansavelmente em todas as etapas deste trabalho transmitindo seu conhecimento com grande disposição, pelos conselhos e bons momentos de descontração consequentes da nossa amizade.

Às colegas do Laboratório de Hemostasia, Clévia, Roberta, Daiane, Fernanda Ana Maria, Celina, Carla, e Luciana, pela agradável convivência, amizade e troca de idéias.

Aos professores do curso de Biomedicina, por tudo o que ensinaram, pois o conhecimento interdisciplinar é fundamental para a concretização de um trabalho de conclusão de curso apesar do seu enfoque mais específico.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Farmacocinética e farmacodinâmica da varfarina.....	7
1.2. Sensibilidade ao fármaco.....	9
1.3. Monitoramento da dose	11
1.4. Fatores genéticos têm influência sobre a dose terapêutica	13
1.5. Proteína C.....	14
1.6. Fator VII	16
1.7. Predição da dose auxilia o tratamento	17
2. ARTIGO	19
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFIA.....	36
FONTES DA INTERNET	42

RESUMO

A varfarina é o anticoagulante oral mais utilizado para a prevenção e tratamento de pacientes com desordens tromboembólicas arteriais e venosas. Ela impede a regeneração da vitamina K oxidada à forma reduzida, o que afeta a carboxilação e funcionalidade dos fatores de coagulação II, VII, IX e X e proteínas C, S e Z. Existe uma grande dificuldade de encontrar a dose terapêutica para cada paciente já que a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento são influenciadas por fatores ambientais e genéticos. Isso pode resultar em sangramentos ou tromboembolismo até que a anticoagulação esteja controlada. Com o propósito de tornar o tratamento mais seguro, têm sido propostos algoritmos para predição da dose, que incluem fatores genéticos e não genéticos. Polimorfismos em diversos genes envolvidos no metabolismo e modo de ação da varfarina estão associados à dose terapêutica do anticoagulante. Os mais importantes são o CYP2C9 (codifica a enzima citocromo P450 2C9) e o VKORC1 (codifica a subunidade 1 do complexo vitamina K epóxido redutase). Os genes de proteínas dependentes de vitamina K também podem ter influência na dose, tais como o gene da proteína C (PROC) e do fator VII da coagulação (F7). Os objetivos deste estudo foram investigar a influência dos SNP's PROC -1654C>T e F7 1238G>A na dose de varfarina e verificar a interação entre eles e outros fatores genéticos e não-genéticos para possível inclusão em um algoritmo previamente elaborado. Foram estudados 279 pacientes eurodescendentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, usuários de varfarina, com INR (relação normalizada internacional) dentro alvo. As genotipagens foram feitas por PCR/RFLP. Os testes estatísticos empregados foram ANOVA, exato de Fisher e regressão linear múltipla. Houve grande variabilidade entre as doses (7,5 a 85mg/semana), sendo 33,5mg/semana a dose média. Não houve diferença significativa entre as médias das doses de cada genótipo do PROC ($P=0,4$) e F7 ($P=0,7$). Também não houve diferença significativa de frequências genotípicas entre indivíduos com doses extremas ($P=0,3$ para PROC, e $P=0,8$ para F7). Em interação com outros fatores, os polimorfismos estudados não se

mostraram associados à dose ($P > 0,05$). Este estudo sugere que os SNP's PROC -1654C>T e F71238G>A não estão associados com a dose terapêutica de varfarina na população do sul do Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Os anticoagulantes orais são muito utilizados na prática clínica para a prevenção e tratamento de pacientes com desordens tromboembólicas arteriais e venosas (Hirsh *et al.*, 2001). A classe mais prescrita é a dos cumarínicos, da qual faz parte a varfarina. Suas indicações mais comuns são: fibrilação atrial, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, isquemia, prótese valvular, cardiomiopatia, e infarto do miocárdio (Gage *et al.*, 2004).

1.1. Farmacocinética e farmacodinâmica da varfarina

Depois da administração oral, a varfarina é completamente absorvida na ausência de patologias, e 99% liga-se à albumina plasmática. A varfarina livre é biologicamente ativa no fígado, onde também é metabolizada por enzimas da família citocromo P450 (Gage *et al.*, 2006). Ela é uma mistura racêmica dos seus enantiômeros R e S, os quais diferem nas concentrações plasmáticas, na potência antitrombótica, e na especificidade das isoenzimas responsáveis pelo seu metabolismo. O enantiômero S é de duas a cinco vezes mais potente do que o enantiômero R e é responsável por cerca de 70% de toda atividade anticoagulante do fármaco (Ufer, 2005). A enzima hepática citocromo P450 2C9 é a principal metabolizadora desse enantiômero. Ela faz a conversão do enantiômero S-varfarina a 6- e 7-hidroxivarfarina sendo assim excretado na bile (Redman, 2001).

Esse medicamento atua na reciclagem da vitamina K, e seu mecanismo de ação está representado na figura 1. Assim como os outros cumarínicos, a varfarina impede que a vitamina K oxidada (vitamina K 2,3-epóxi) seja convertida à forma reduzida (hidroquinona), através da inibição da enzima vitamina K epóxido redutase. A redução ocorre em dois passos: primeiro, a vitamina K 2,3-epóxi é reduzida à K_1 (ou filoquinona, forma encontrada nos alimentos vegetais), e em seguida a vitamina K_1 é reduzida à hidroquinona. O segundo passo não é afetado diretamente pelo anticoagulante (Fasco *et al.*, 1982).

A vitamina K hidroquinona atua como cofator da enzima γ -glutamil carboxilase na reação de carboxilação de proteínas da coagulação, tornando-se, então, oxidada (inativa). Como a regeneração da vitamina é impedida pela varfarina, ocorre inibição da γ -carboxilação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K - fatores II, VII, IX e X - e de inibidores fisiológicos da coagulação - proteínas C, S e Z. A γ -carboxilação é a adição de um grupo carboxil ao carbono γ de um resíduo específico de ácido glutâmico. Tal modificação pós-traducional converte um resíduo de ácido glutâmico à γ -carboxiglutâmico, negativamente carregado (Suttie, 1985). Na presença de íons cálcio os fatores de coagulação ligam-se a eles (por meio do resíduo negativo) e sofrem uma mudança conformacional que promove a adesão às membranas fosfolipídicas das plaquetas (Nelsestuen, 1976). Como a ligação do cálcio é essencial para que as proteínas pró-coagulantes desempenhem sua função fisiológica, o bloqueio da carboxilação acarreta anticoagulação. Embora os cumarínicos também inibam a carboxilação das proteínas C, S e Z, a inibição da atividade dos fatores de coagulação é o principal efeito farmacológico (Gage *et al.*, 2006).

A anticoagulação somente é observada 2 dias após o início da administração da varfarina, em decorrência do tempo levado para a degradação dos fatores carboxilados presentes no plasma. O fator VII, com a menor meia-vida (6 horas), é o primeiro a ser afetado, seguido pelos fatores IX, X e II, que possuem meias-vidas de 24, 40 e 96 horas respectivamente. O efeito anticoagulante pode ser revertido pela administração terapêutica ou ingestão de alimentos ricos em vitamina K₁, uma vez que o segundo passo de redução é relativamente insensível aos antagonistas da vitamina K (Hirsh *et al.*, 2001).

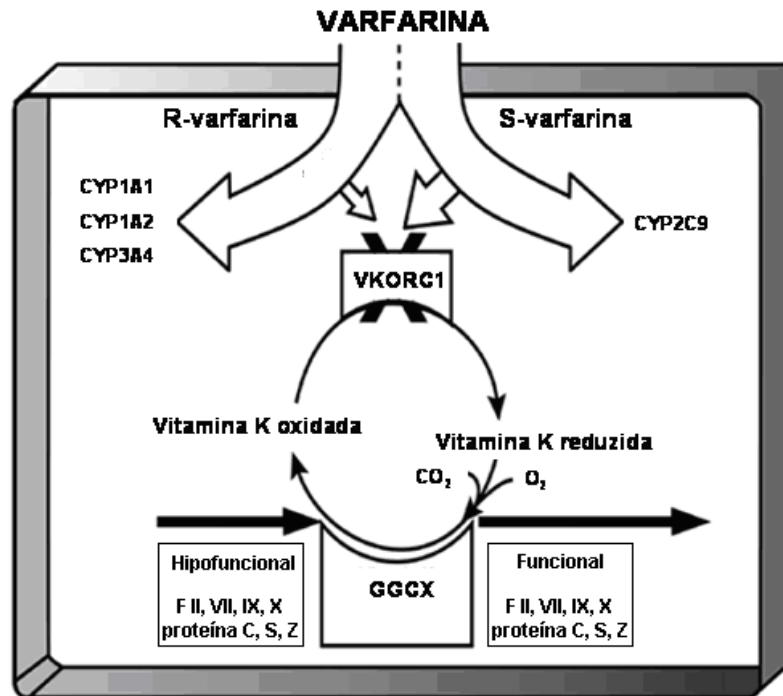


Figura 1. Nos hepatócitos, os enantiômeros R e S são metabolizados por diferentes enzimas do citocromo P450 (codificadas por CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 e CYP2C9). A varfarina atua como antagonista da vitamina K, inibindo a vitamina K epóxido redutase (subunidade codificada pelo gene VKORC1). Ao impedir a regeneração de vitamina K reduzida, a varfarina prejudica carboxilação de fatores de coagulação e inibidores fisiológicos da coagulação pela γ -glutamil carboxilase (codificada pelo GGCX) (adaptado de Gage, 2006).

1.2. Sensibilidade ao fármaco

Existe uma grande variação interindividual na sensibilidade aos cumarínicos, uma vez que a farmacocinética e a farmacodinâmica são influenciadas por fatores ambientais e genéticos. Na população, a dose terapêutica varia em uma média de 4mg a 80mg semanais (Gage & Lesko, 2008a).

A baixa dose de varfarina, ou seja, maior sensibilidade, pode estar associada a diversos fatores como idade avançada, peso corporal baixo, sexo feminino, eurodescendência (comparado a afrodescendência), concentração de

albumina plasmática baixa, uso de tabaco, baixos INRs (relação normalizada internacional) alvos, doenças hepáticas, insuficiência cardíaca, alguns medicamentos, falta de exercícios físicos e uma dieta com baixo aporte de vitamina K. Por outro lado, a dose aumenta com a área de superfície corporal, INR alvo e depuração de creatinina (Gage *et al.*, 2004).

A menor dose de anticoagulante requerida por pacientes mais idosos pode ser explicada pela diminuição do *clearance* do medicamento (Shepherd *et al.*, 1977; Gurwitz *et al.*, 1992; Loebstein *et al.*, 2001). A área de superfície corporal correlaciona-se com a dose de varfarina provavelmente porque ela está correlacionada com o tamanho do fígado e, conseqüentemente, com a depuração hepática dos cumarínicos (Wynne *et al.*, 1995).

Diversos medicamentos podem fazer interações medicamentosas com a varfarina, aumentando ou diminuindo o efeito anticoagulante. A interação pode ser por inibição ou indução de enzimas metabolizadoras. O *clearance* da S-varfarina é inibido por fenilbutazona, sulfimpirazona, metronidazol, e trimetoprim-sulfametoxazol, os quais potencializam o efeito da varfarina. A amiodarona inibe o *clearance* dos dois isômeros, também resultando em potenciação do efeito (Hirsch *et al.*, 2001). O mesmo mecanismo de interação é sugerido para a sinvastatina (Westergren *et al.*, 2007). Outra hipótese argumenta que a diminuição dos níveis lipídicos causada pela sinvastatina diminui a concentração de vitamina K no plasma (Hickmott *et al.*, 2003), já que ela tem seu transporte feito através da apolipoproteína E. O efeito anticoagulante é inibido por carbamazepina, barbitúricos e rifampicina, os quais induzem as enzimas hepáticas. Outros medicamentos podem influenciar a farmacodinâmica da varfarina por inibirem a síntese (terceira geração de cefalosporinas) ou aumentarem o *clearance* (tiroxina) dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K. Fármacos como aspirina, antiinflamatórios não esteróides, altas doses de penicilina, e moxolactam, aumentam o risco de sangramento por inibirem a função plaquetária (Hirsch *et al.*, 2001).

Doenças hepáticas prejudicam a síntese dos fatores de coagulação, enquanto que estados hipermetabólicos (febre, hipertireoidismo) aumentam o catabolismo deles. Essas situações potencializam a resposta aos anticoagulantes (Richards, 1943; Owens *et al.* 1962). A variação da ingestão de vitamina K também altera a resposta dos pacientes em tratamento com varfarina. O aumento do aporte acontece em dietas para perda de peso, ou com o consumo de suplementos com vitamina K; e uma diminuição do aporte da vitamina ocorre em pacientes tratados com antibióticos e fluidos intravenosos sem vitamina K, e em estados de má absorção (Hirsh *et al.*, 2001).

Além disso, a dose de varfarina varia entre grupos étnicos, sendo a dose semanal média para asiáticos 24mg, hispânicos 31mg, eurodescendentes 36mg, e africanos 43mg ($P < 0,001$), sugerindo que a variação genética contribui para a variabilidade interindividual na resposta ao medicamento (Dang *et al.*, 2005). Vários estudos apontam polimorfismos em genes importantes na dinâmica e cinética da varfarina que influenciam a resposta ao tratamento e são capazes de explicar grande parte da variação da dose.

1.3. Monitoramento da dose

A dificuldade de encontrar a dose terapêutica para cada paciente acarreta em risco de episódios hemorrágicos ou fenômenos tromboembólicos, até que a anticoagulação esteja controlada. A hipoprotrombinemia, com ou sem sangramento, é um efeito adverso que acomete 6-39% dos pacientes anticoagulados anualmente (Krynetskiy & McDonnell, 2007). Dentre pacientes chineses, eventos hemorrágicos graves ocorreram em uma taxa aceitável (1,8%), enquanto que sangramentos menores foram consideráveis (18,5%) (Chan & Mil, 2004).

A dose inicial de varfarina (2-10mg) é receitada com base na indicação ou em fatores intrínsecos e extrínsecos. Conforme a resposta do paciente, a dose é aumentada ou diminuída por tentativa e erro. Devido à grande diferença na sensibilidade ao anticoagulante entre os pacientes, o estado de coagulação

deve ser avaliado periodicamente para o ajuste da dose e sucesso do tratamento. O monitoramento da anticoagulação é realizado pelo tempo de protrombina (TP), e o resultado é expresso pelo INR (relação normalizada internacional).

O TP é um teste que mede o tempo de formação do coágulo a partir da ativação da coagulação por fator tissular. À amostra de plasma a 37°C, é adicionado cálcio (para reverter o efeito do citrato de sódio usado na coleta do sangue) e tromboplastina (fator tissular e fosfolipídeos, que desencadeiam a via extrínseca da coagulação). O tempo que a amostra leva para coagular é mensurado. Os tempos obtidos nas amostras do paciente e do controle são comparados, sendo que o tempo obtido num plasma normal é de 11 a 14,6 segundos. Por serem empregados diferentes tipos de tromboplastina na obtenção do TP, a Organização Mundial de Saúde preconizou o uso do INR para padronizar mundialmente o resultado do teste. O INR é a razão do TP do paciente pelo TP do controle, elevada ao *International Sensitivity Index* (ISI) do reagente. Cada fabricante de tromboplastina fornece o ISI, que varia entre 1,0 e 1,4. A anticoagulação é avaliada somente pelo INR, como visto, uma forma de TP corrigido a padrões mundiais. Isso significa que o INR de um paciente é praticamente o mesmo se ele for testado em diferentes laboratórios no mundo inteiro. Um indivíduo que não faz uso de anticoagulante costuma ter o INR próximo de 1. Após o início da anticoagulação, o valor tende a aumentar, de forma que, quanto maior o INR mais anticoagulado está o paciente.

A padronização de resultados permite que sejam recomendados determinados valores de INR dependendo da indicação clínica da anticoagulação, chamados de alvos. Para a maioria das indicações – profilaxia/tratamento de trombose venosa, tratamento de embolia pulmonar, prevenção de embolia sistêmica, doença cardíaca valvar, válvula cardíaca de tecido, fibrilação atrial – recomenda-se INR entre 2 e 3. Porém, para alguns tipos de próteses mecânicas de válvula cardíaca, pós-infarto do miocárdio e certos casos de trombose e síndrome antifosfolípido, o alvo recomendado é de 2,5 a 3,5 (Hirsh *et al.*, 2001).

Logo, com base no INR alvo e no INR que o paciente está apresentando, a dose do anticoagulante é ajustada por tentativa e erro ou mantida, caso o alvo já tenha sido atingido. A dose necessária para manter um indivíduo no alvo é a dose terapêutica dele.

1.4. Fatores genéticos têm influência sobre a dose terapêutica

O metabolismo e o modo de ação da varfarina envolvem pelo menos 30 genes (Wadelius *et al.*, 2007). A figura 2 mostra os genes que estão envolvidos na biotransformação da vitamina K, da varfarina e dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K. As pesquisas têm mostrado que variantes de alguns desses genes estão associadas com a dose terapêutica e, portanto, são responsáveis por parte das diferenças interpopulacionais e interindividuais observadas na sensibilidade aos cumarínicos.

Estudos em diversas populações, incluindo os estudos brasileiros de Perini *et al.* (2008) e Botton (2010), demonstraram que os genes CYP2C9 e VKORC1 são os mais importantes em relação à dose. O gene CYP2C9 codifica a principal enzima da farmacocinética da varfarina, citocromo P450 2C9, e o VKORC1 codifica a subunidade 1 do complexo vitamina K epóxido redutase, a enzima alvo do fármaco e mais importante da farmacodinâmica. Enquanto que fatores ambientais explicam 17-21% da variabilidade da dose (Gage *et al.*, 2008b), as variantes genéticas CYP2C9*2, CYP2C9*3 e VKORC1 -1639G>A, juntamente com fatores ambientais, explicam 53-63% da variação interindividual da dose terapêutica de varfarina (Sconce *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2007; Gage *et al.*, 2008b). Isso sugere que polimorfismos de outros genes também contribuem para tal variação. Os genes dos fatores de coagulação II, VII, IX e X e proteínas C e S têm sido investigados, já que seus produtos são dependentes da vitamina K. Neste estudo, foram investigados polimorfismos nos genes da proteína C e do fator VII.

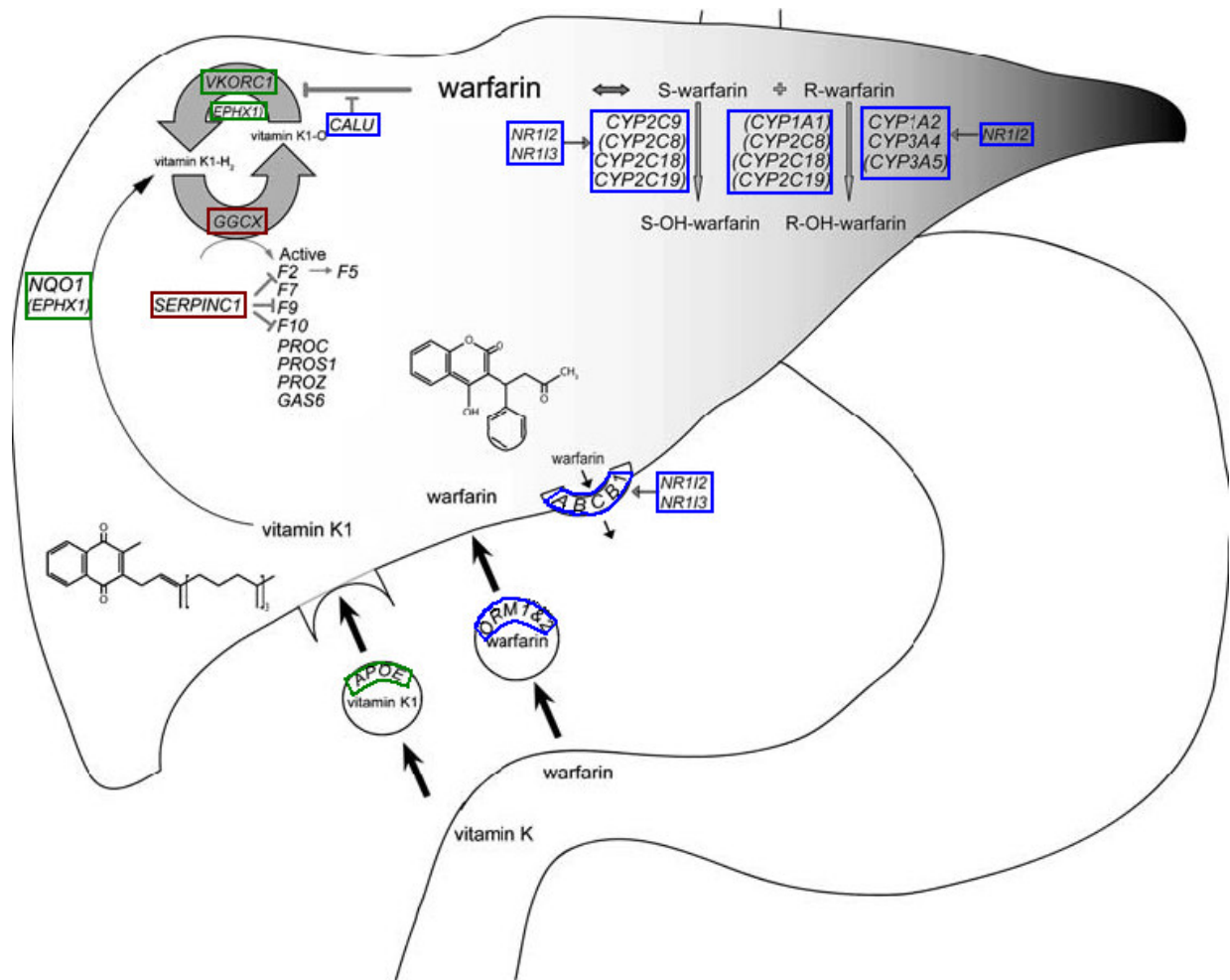


Figura 2. Os genes envolvidos na biotransformação da vitamina K estão marcados com retângulos em verde, da varfarina em azul, e das proteínas da coagulação em vermelho (adaptado de Wadelius, 2007).

1.5. Proteína C

A proteína C, inicialmente caracterizada por Kiesel (1979), existe no plasma como um zimogênio, e é ativada quando clivada pelo complexo trombina-trombomodulina. A forma ativa contém um domínio serina protease com atividade anticoagulante. Ela exerce tal função por inativar os fatores Va (ativado) e VIIIa em presença de fosfolípidos, Ca^{++} e proteína S (Dahlbäck, 1991).

O gene que codifica a proteína C, PROC, está localizado no cromossomo 2q13-q14 e compreende 9 éxons e 8 íntrons (Plutzky *et al.*, 1986). Pesquisadores já encontraram mais de 160 mutações diferentes do gene da proteína C que levam à ausência ou a uma forma defeituosa da proteína (Reitsma *et al.*, 1995). Dentre os polimorfismos já identificados na região 5' não traduzida, está o SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*) PROC -1654C>T (rs1799808), na região promotora. A importância da substituição de C por T não é conhecida, porém é possível que esse polimorfismo tenha um efeito na regulação da expressão do gene PROC (Hoshi *et al.*, 2007).

O polimorfismo PROC -1654C>T está em desequilíbrio de ligação com outros dois, o PROC -1641A>G e o PROC -1476A>T. Os genótipos CC/GG/TT estão associados ($P < 0,0001$) com menores níveis plasmáticos de proteína C (Spek *et al.*, 1995).

No trabalho de Wadelius *et al.* (2007), com pacientes eurodescendentes ($n=201$), foi encontrada associação entre quatro polimorfismos no PROC (dois na região regulatória 5', um no íntron 2 e outro no íntron 3) e a dose de varfarina, dentre eles o PROC -1641A>G ($P=0,0005$). Nesse trabalho, pacientes homocigotos para o alelo G necessitavam de menor dose do anticoagulante. Indivíduos com genótipo GG têm menor atividade de proteína C, o que está intrigantemente associado com maior INR afinal, esses indivíduos deveriam ter sua função anticoagulante reduzida (Watala *et al.*, 2003). Em vista do INR mais elevado, o uso de uma dose menor do fármaco pelos pacientes GG do estudo de Wadelius *et al.* (2007) pode ser explicado. Já o estudo de Wang *et al.* (2008), mostrou não haver associação do polimorfismo PROC -1641A>G ($P=0,437$) com a dose de varfarina em chineses anticoagulados ($n=318$).

Até o momento, não há estudos que relacionem o polimorfismo PROC -1654C>T com a dose de varfarina, mas como está em desequilíbrio de ligação com o PROC -1641A>G, que mostrou associação no trabalho de Wadelius *et al.* (2007), ele pode estar associado. A frequência do alelo T é de 30% em europeus, 10% em africanos, 46% em chineses hans e 61% em japoneses (NCBI SNPdb, 1).

1.6. Fator VII

O fator VII da coagulação é uma glicoproteína serina protease essencial na via extrínseca da coagulação sanguínea. Ele circula na forma de zimogênio, mas ao se associar com o fator tecidual, uma proteína de membrana exposta quando o lúmen vascular está lesionado, o fator VIIa desencadeia a ativação de outros fatores (Rapaport & Rao, 1995). Como o fator VIIa é a primeira protease ativa na via extrínseca e contribui para a iniciação da cascata, seus níveis podem ser importantes para o resultado de um evento trombótico, por exemplo, na determinação do tamanho de um trombo oclusivo após a ruptura das placas ateroscleróticas.

O gene que codifica o fator VII, denominado F7, localiza-se no cromossomo 13q34. Wadelius *et al.* (2007) estudou onze polimorfismos do F7, e não encontrou associação entre nenhum deles independentemente e a dose de varfarina. Os polimorfismos F7 -402G>A e um número variável de repetições (de 37pb) no intron 7 do F7 não apresentaram influência significativa na dose no trabalho de Herman *et al.* (2006). Todavia, o haplótipo desses dois polimorfismos e o F7 -746T>C apresentou associação no estudo de Shikata *et al.* (2004).

Estudos mostram que polimorfismos no gene F7 são os principais determinantes dos níveis plasmáticos de FVIIc (atividade coagulante) e FVIIAg (antígeno), mas há menos evidências de que eles sejam responsáveis pelos níveis de FVIIa (fator VII ativado) (Bernardi *et al.*, 1997).

O polimorfismo F7 1238G>A (rs6046) no éxon 8 acarreta uma troca de arginina (alelo G ou M1) por glutamina (alelo A ou M2) no códon 353 (R353Q). Sugere-se que a troca de aminoácido resulta em alteração na conformação da proteína, o que causa redução na secreção (Heywood *et al.*, 1996). Vários estudos observaram baixos níveis de FVIIc em indivíduos com o alelo M2 comparado com homozigotos M1. O estudo multicêntrico europeu de Bernardi *et al.* (1997) revelou uma grande contribuição dos polimorfismos F7 1238G>A e inserção/deleção 5'F7 (alelo A2 e A1, respectivamente) nos níveis de FVIIa -

maior do que para FVIIc e FVIIAg. Os alelos M2 e A2 mostraram-se associados a níveis reduzidos de FVIIa, principalmente. Apesar do desequilíbrio de ligação entre 1238G>A e inserção/deleção 5'F7, foi possível analisar genótipos em que os alelos M2 e A2 não estavam acoplados, e concluir que o alelo M2 é o principal contribuinte na redução dos níveis de FVIIa, FVIIc e FVIIAg – diferentemente de uma investigação anterior, que apontou o A2 como maior responsável (Humphries *et al.*, 1996). Um estudo chinês mais recente (Huang *et al.*, 2009) corrobora com o estudo europeu citado.

Já foi visto que o nível elevado de FVIIc é fator de risco para doença coronariana, especialmente na presença de fatores de risco adicionais (Junker *et al.*, 1997). O FVII está relacionado ao estado de coagulação, sendo um dos fatores que apresenta maior associação com o INR (Watala *et al.*, 2003). Pacientes que tiveram trombose e aqueles com púrpura trombocitopênica idiopática apresentam-se com níveis significativamente maiores que os controles. Já os níveis plasmáticos de FVIIa em pacientes que tiveram trombose mas fazem tratamento com varfarina mostram-se similares aos dos controles (Yamada *et al.*, 1996).

Sendo o polimorfismo F7 1238G>A um dos grandes responsáveis pelo nível de FVIIa, e este um determinante do estado de coagulação, pode-se esperar que tal polimorfismo tenha influência sobre a dose terapêutica de varfarina. Nos estudos de Shikata *et al.* (2004) e Ohno *et al.* (2009), foi observado que o polimorfismo F7 1238G>A não afeta a dose de varfarina em pacientes japoneses. Entretanto, não há estudos a respeito com pacientes eurodescendentes. As frequências do alelo A (M₂) são semelhantes entre indivíduos japoneses, descendentes de europeus e descendentes de africanos, sendo elas 7, 10 e 14%, respectivamente (NCBI SNPdb, 2).

1.7. Predição da dose auxilia o tratamento

Apesar da eficácia dos tratamentos com varfarina, existem dificuldades quanto à segurança. A faixa terapêutica é estreita (risco aumentado de

hemorragia), a manutenção da anticoagulação no INR alvo é complicada, e a dose de manutenção é muito variável.

O conhecimento da farmacogenética dos cumarínicos pode auxiliar os médicos a calcularem a dose terapêutica de cada paciente, diminuindo assim, o risco de hemorragia durante o início do tratamento (Gage *et al.*, 2004). Em 16 de agosto de 2007, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a nova bula da varfarina. Nela, deve vir a recomendação, mas não obrigação, da realização de testes moleculares para a detecção das variantes genéticas do CYP2C9 e do VKORC1 para que sejam evitadas as graves reações adversas ocasionadas por esse medicamento em alguns pacientes (Gage *et al.*, 2008a). Porém, para a aplicação dos resultados dos testes, cada população deverá desenvolver o seu algoritmo específico (Thompson, 2007), devido à grande diferença nas frequências dessas variantes genéticas entre as etnias. Dois grupos propuseram algoritmos para a população brasileira, Perini *et al.* (2008) e Botton (2010).

Alguns algoritmos propostos já foram validados. A validação consiste em usar o algoritmo para prever a dose em outra amostra (não aquela a partir da qual ele foi elaborado), e verificar se os pacientes atingem o INR alvo com esta dose predita (estudo prospectivo); ou, comparar a dose predita pelo algoritmo com a dose terapêutica dos pacientes, também em uma amostra independente (estudo retrospectivo). Os resultados apontam para a necessidade de se desenvolver algoritmos população-específicos, pois quando os modelos são testados em populações diferentes da população em que o algoritmo se baseou, eles apresentam menores coeficientes de determinação (Lubitz *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2010).

2. ARTIGO

Artigo a ser submetido para publicação na revista Genetics and Molecular Biology.

Farmacogenética da varfarina: polimorfismos dos genes PROC e F7

Taciane Borsatto¹; Mariana Rodrigues Botton¹; Mara Helena Hutz¹; Luís Eduardo Rohde²; Luís Carlos Amon³; Eliane Bandinelli¹.

1 Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

2 Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

3 Serviço de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Título resumido: Farmacogenética da varfarina

Palavras-chave: varfarina, farmacogenética, polimorfismos, PROC, F7.

Autor correspondente:

Eliane Bandinelli, Dra.

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Tel.: (51) 3308 6736

E-mail: eliane.bandinelli@ufrgs.br

RESUMO

A varfarina é o anticoagulante oral mais utilizado no tratamento e prevenção de desordens tromboembólicas. Ela bloqueia a regeneração da vitamina K reduzida, cofator da carboxilação dos fatores de coagulação II, VII, IX e X e das proteínas C e S. Existe grande variação interindividual na resposta ao anticoagulante, já que é influenciada por fatores ambientais e genéticos. Polimorfismos nos genes da enzima alvo (VKORC1) e da enzima metabolizadora (CYP2C9) da varfarina explicam parte da variação da dose terapêutica. Outras variantes genéticas também foram relacionadas com a dose. Neste estudo, investigou-se a influência dos polimorfismos PROC -1654C>T (gene da proteína C) e F7 1238G>A (gene do fator VII) na dose de varfarina e verificou-se a interação com outros fatores previamente estudados na amostra. A dose semanal média de varfarina foi 33,5mg (amplitude 7,5mg-85mg). Para ambos os polimorfismos, não houve diferença significativa entre as médias das doses de cada genótipo e entre as frequências genótípicas de pacientes com doses baixas e altas ($P>0,05$). Quando analisados em conjunto com dados clínicos e genótipos dos genes CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 e F2, os polimorfismos de PROC e F7 também não influenciaram a dose ($P>0,05$). Os resultados indicam que os polimorfismos PROC -1654C>T e F7 1238G>A não estão associados com a dose de varfarina na população estudada.

INTRODUÇÃO

A varfarina é um anticoagulante oral comumente indicado a pacientes com fibrilação atrial, prótese valvular, cardiomiopatia, e no tratamento ou prevenção de trombose venosa profunda, embolia pulmonar, isquemia e infarto do miocárdio (Gage *et al.*, 2004). Ela atua nos hepatócitos impedindo que a vitamina K oxidada seja reduzida ao inibir a enzima vitamina K epóxido redutase (Gage *et al.*, 2006).

Existe uma grande variação interindividual na sensibilidade ao fármaco. Na população, a dose terapêutica varia em uma média de 4mg a 80mg semanais (Gage & Lesko, 2008a). A variação da dose se deve à influência de fatores ambientais e genéticos. Estudos em diversas populações, incluindo os estudos brasileiros de Perini *et al.* (2008) e Botton (2010), demonstraram que os genes CYP2C9 (codifica a enzima citocromo P450 2C9, principal metabolizadora da varfarina) e VKORC1 (codifica a subunidade 1 do complexo vitamina K epóxido redutase, a enzima alvo do fármaco) são os mais importantes em relação à dose.

Enquanto que fatores ambientais explicam 17-21% da variabilidade da dose terapêutica de varfarina (Gage *et al.*, 2008b), as variantes genéticas CYP2C9*2, CYP2C9*3 e VKORC1 -1639G>A, juntamente com fatores ambientais, explicam 53-63% (Sconce *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2007; Gage *et al.*, 2008b). Isso sugere que polimorfismos de outros genes também contribuem para tal variação. Os genes dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K e proteínas C e S, entre outros, têm sido investigados.

A proteína C possui função anticoagulante por inativar os fatores Va (ativado) e VIIIa em presença de fosfolípidios, Ca^{++} e proteína S (Dahlbäck, 1991). Dentre os polimorfismos já identificados na região 5' não traduzida do gene da proteína C (PROC), está o SNP PROC -1654 C>T (rs1799808) na região promotora. A importância dessa substituição não é conhecida, porém é possível que tenha um efeito na regulação da expressão do gene PROC (Hoshi *et al.*, 2007). O genótipo CC mostra-se associado com menores níveis plasmáticos de proteína C ($P < 0,0001$) (Spek *et al.*, 1995). A frequência do alelo T é de 30% em europeus, 10% em africanos, 46% em chineses hans e 61% em japoneses (NCBI SNPdb, 1).

O fator VII da coagulação é ativado ao se associar com o fator tecidual (exposto quando o lúmen vascular está lesionado) e desencadeia a ativação de outros fatores devido à sua atividade serina protease (Rapaport & Rao, 1995). O polimorfismo 1238G>A (rs6046) no éxon 8 do gene do fator VII (F7) provoca uma troca de arginina (alelo G ou M1) por glutamina (alelo A ou M2) no códon 353 (R353Q). Sugere-se que a troca de aminoácido resulta em alteração na conformação da proteína, o que causa redução na secreção (Heywood *et al.*, 1996). O alelo A (M2) está associado a níveis reduzidos de FVIIa, FVIIc e FVIIAg (Bernardi *et al.* 1997). As frequências do alelo A são semelhantes entre indivíduos japoneses, euro e afrodescendentes, sendo elas 7, 10 e 14%, respectivamente (NCBI SNPdb, 2).

Perini *et al.* (2008) e Botton (2010) propuseram algoritmos de predição da dose para a população brasileira. Com o intuito de aprimorar o algoritmo elaborado para a população do sul do Brasil (Botton, 2010) e, dessa forma,

contribuir para a adoção de um tratamento mais eficaz e seguro desses pacientes, os objetivos do presente estudo foram: investigar a influência dos polimorfismos PROC -1654C>T e F7 1238G>A na dose de varfarina e verificar a interação entre eles e outros fatores genéticos e não-genéticos descritos para possível inclusão no algoritmo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 279 pacientes eurodescendentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre usuários de varfarina, com mais de 18 anos e que concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido. Incluiu-se no estudo somente pacientes que mantiveram o INR no seu alvo por pelo menos duas consultas consecutivas (em média uma consulta por mês). A dose de varfarina utilizada por cada paciente no período em que estava com o INR no alvo – dose terapêutica - foi obtida a partir dos prontuários. A maioria dos pacientes tinha o INR alvo entre 2 e 3, exceto aqueles com prótese de válvula mitral, os quais tinham INR alvo de 2,5 a 3,5. Os pacientes foram incluídos independentemente do alvo porque os INRs médios de indivíduos com cada genótipo não apresentam diferença estatisticamente significativa.

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico com o kit de purificação de DNA genômico PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As genotipagens dos polimorfismos -1654C>T do gene PROC e 1238G>A do gene F7 foram realizadas pelo método de PCR/RFLP. O polimorfismo do gene PROC

foi identificado conforme condições de amplificação e clivagem descritas por Spek *et al.* (1994), sendo utilizada a enzima *BstXI* para a clivagem. O polimorfismo do gene F7 foi identificado conforme condições de amplificação e clivagem descritas por Heywood *et al.* (1996), utilizando a enzima *MspI* para a clivagem. Para ambos os polimorfismos a verificação dos genótipos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

O teste qui-quadrado foi usado para verificar se as frequências genotípicas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para analisar a influência dos genótipos na dose terapêutica da varfarina, foram realizados os testes ANOVA e exato de Fisher. O teste ANOVA foi feito com o logaritmo na base dez da dose semanal média de varfarina de cada genótipo. O teste exato de Fisher foi usado para comparar as frequências genotípicas entre pacientes com doses extremas. Consideraram-se como baixas as doses menores do que 20mg/semana (aproximadamente a dose semanal média menos o desvio padrão) e como altas as doses maiores do que 45mg/semana (aproximadamente a dose semanal média mais o desvio padrão). Testes de regressão linear múltipla foram executados para verificar a interação dos polimorfismos PROC -1654C>T e F7 1238G>A com outras variáveis (genéticas e não genéticas), que foram obtidas de um estudo prévio com a mesma amostra. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS 18, e os gráficos com o BioEstat 5.0.

RESULTADOS

A idade média dos pacientes estudados foi 62,6 anos ($DP \pm 14,1$), variando de 18 a 88 anos. A maioria era do sexo masculino (55,6%). Houve grande variabilidade entre as doses terapêuticas, a menor dose semanal foi 7,5mg e a maior foi 85mg. A dose terapêutica média foi 33,5mg/semana ($DP \pm 14,1$). Dos 279 pacientes estudados, 83 apresentaram doses extremas (considerando um desvio padrão acima e abaixo da média), sendo 42 com doses baixas (< 20 mg) e 41 com doses altas (> 45 mg).

A amostra está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois polimorfismos testados. Para o polimorfismo -1654C>T do gene PROC, a frequência do alelo T foi igual a 35%. A dose semanal média de varfarina por genótipo foi: 32,9mg para CC; 34,5mg para CT e 31mg para TT. Não houve diferença significativa ($P=0,474$) entre as doses médias de varfarina (Tabela 1, figura 1A). As frequências dos genótipos entre indivíduos com dose baixa e indivíduos com dose alta não foram significativamente diferentes ($P_{\text{Fisher}}=0,306$) (Tabela 2).

Em relação ao polimorfismo 1238G>A do gene F7, a frequência do alelo A (M_2) foi de 15%. As doses médias semanais de varfarina foram: 33,7mg para homozigotos GG (M_1M_1), 32,5mg para heterozigotos GA (M_1M_2), e 35,8mg para homozigotos AA (M_2M_2). Para esse polimorfismo, também não houve diferença significativa ($P=0,739$) entre as doses do fármaco (Tabela 1, figura 1B). Entre indivíduos com dose baixa e alta, não houve diferença significativa de frequências genotípicas ($P_{\text{Fisher}}=0,851$) (Tabela 2).

Os dados obtidos neste estudo foram analisados por regressão linear múltipla, juntamente com os seguintes dados previamente apurados por Botton (2010): idade, peso, uso de amiodarona, carbamazepina, β -bloqueador, anlodipino, diuréticos, genótipos do CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 e F2. Esses outros dados fazem parte de um algoritmo que explica 63,3% da variação da dose de varfarina ($R^2_{\text{ajust}}=0,633$). Na regressão, os polimorfismos PROC -1654C>T e F7 1238G>A continuaram sem influência sobre a dose do fármaco ($P>0,05$). A inclusão deles no algoritmo diminuiu o coeficiente de determinação ($R^2_{\text{ajust}}=0,596$). Quando analisados novamente com os fatores idade, peso, e medicamentos, mas não com os genótipos do CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 e F2, os polimorfismos estudados continuaram sem significância ($P>0,05$).

DISCUSSÃO

A varfarina é um anticoagulante oral amplamente prescrito apesar dos efeitos adversos graves. Estudos em diferentes populações vêm encontrando associação entre polimorfismos de genes do metabolismo e mecanismo de ação da varfarina e a dose terapêutica. Um único estudo realizado na população Sueca (Wadelius *et al.*, 2007) identificou polimorfismos relacionados à dose em 10 genes (VKORC1, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, PROC, APOE, EPHX1, CALU, GGCX e ORM1-ORM2).

Neste estudo foi investigada a influência dos SNP's -1654C>T no promotor do gene PROC e 1238G>A no éxon 8 do gene F7 sobre a variação da dose terapêutica da varfarina. As frequências alélicas encontradas, 35% para o

alelo T e 15% para o A, foram semelhantes às aquelas descritas em outras amostras de descendentes de europeus, sendo 30 e 10%, respectivamente (NCBI SNPdb, 1 e 2). A variação interindividual na sensibilidade ao anticoagulante foi evidente (7,5 a 85 mg/semana), porém os resultados deste estudo indicam que os polimorfismos PROC -1654C>T e F7 1238G>A não estão associados com a dose terapêutica de varfarina na população do sul do Brasil.

Até o momento, não há outros estudos que relacionem o polimorfismo PROC -1654C>T com a dose de varfarina, entretanto foi encontrada associação entre a dose e o polimorfismo PROC -1641A>G ($P=0,0005$) (Wadelius *et al.*, 2007) que está em forte desequilíbrio de ligação. Porém, os resultados são controversos. Enquanto que Wadelius *et al.* (2007) observou que o alelo G confere maior sensibilidade ao fármaco em uma amostra da população sueca, Wang *et al.* (2008) não encontrou associação de tal polimorfismo com a dose em pacientes chineses. É possível que na população da Suécia os polimorfismos PROC -1654C>T e -1641A>G estejam segregando junto com outra variante que desempenha um papel na funcionalidade do gene, enquanto que isso não deve ocorrer na população chinesa e brasileira.

Quanto ao polimorfismo F7 1238G>A, não haviam estudos até então com eurodescendentes. Entretanto, nossos resultados corroboraram com os achados de Shikata *et al.* (2004) e Ohno *et al.* (2009), que observaram que o polimorfismo F7 1238G>A não afeta a dose de varfarina em pacientes japoneses.

Os polimorfismos PROC -1654 C>T e F7 1238G>A não aumentaram o coeficiente de determinação do algoritmo proposto por Botton (2010), e também não apresentaram associação com a dose de varfarina quando analisados como únicos fatores genéticos da regressão. Nossos resultados sugerem que os SNP's estudados não são bons candidatos para aplicação clínica na população estudada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à enfermeira Graziella Aliti e a nutricionista Gabriela Souza pela ajuda na coleta de amostras e dados dos pacientes. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil).

REFERÊNCIAS

Botton MR (2010) Farmacogenética da varfarina: proposta de um algoritmo para a predição de dose. Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Dahlbäck B (1991) Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 12;66(1):49-61.

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

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

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

Heywood DM, Gerning ON, Grant PJ (1996) Association of factor VII:C levels with environmental and genetic factors in patients with ischaemic heart disease and coronary atheroma characterised by angiography. *Thromb Haemost.* 76(2):161-165.

Hoshi S, Hijikata M, Togashi Y, Aoyagi T, Kono C, Yamada Y, Amano H, Keicho N, Yamaguchi T (2007) Protein C deficiency in a family with thromboembolism and identified gene mutations. *Intern Med* 46(13):997-1003.

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

Ohno M, Yamamoto A, Ono A, Miura G, Funamoto M, Takemoto Y, Otsu K, Kouno Y, Tanabe T, Masunaga Y *et al.* (2009) Influence of clinical and genetic factors on warfarin dose requirements among Japanese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 65:1097–1103.

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

Rapaport SI, Rao LV (1995) The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74(1):7-17.

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

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

Spek CA, Poort SR, Bertina RM, Reitsma PH (1994) Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2):309-311.

Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH (1995) Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:214-218.

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

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

FONTES DA INTERNET

National Center for Biotechnology Information SNP data base (NCBI SNPdb)

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799808
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6046

Tabela 1. Frequências alélicas e dose de varfarina para cada genótipo dos genes PROC e F7.

Gene	SNP	Alelo	Frequência alélica (%)	Genótipo	n (%)	Dose média de varfarina (mg/semana)	P
PROC	-1654C>T (rs1799808)	C	65	CC	111 (39,7)	32,9	0,474
		T	35	CT	139 (49,8)	34,5	
				TT	29 (10,4)	31	
F7	1238G>A (rs6046)	G (M ₁)	75	GG	200 (71,6)	33,7	0,739
		A (M ₂)	15	GA	70 (25)	32,5	
				AA	9 (3,2)	35,8	

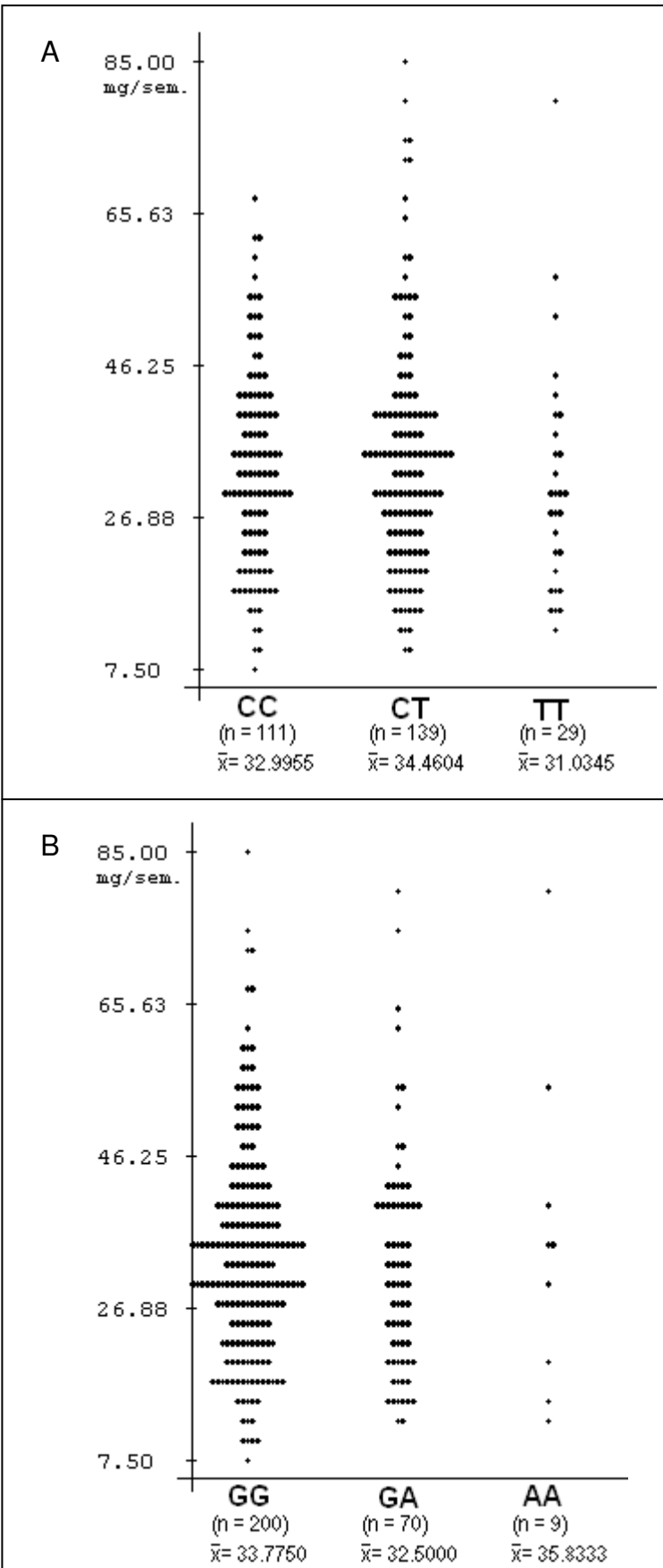


Figura 1. Diagrama pontual das doses de varfarina para cada genótipo do polimorfismo PROC -1654C>T em A, e para os genótipos do F7 1238G>A em B. Todos os genótipos apresentam doses bastante variadas, não havendo diferença significativa entre as médias das doses de cada genótipo para ambos os polimorfismos.

Tabela 2. Frequências dos genótipos entre indivíduos com doses extremas.

Dose semanal		PROC -1654C>T (rs1799808)			F7 1238G>A (rs6046)		
		CC	CT	TT	GG	GA	AA
<20 mg	n	17	18	7	28	12	2
	Frequência	40,5%	42,9%	16,7%	66,7%	28,6%	4,8%
>45 mg	n	15	23	3	30	9	2
	Frequência	36,6%	56,1%	7,3%	73,2%	22,0%	4,9%
				P=0,306		P=0,851	

3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A varfarina é um anticoagulante oral amplamente prescrito apesar dos efeitos adversos graves. Nos primeiros meses de tratamento, o paciente fica a maior parte do tempo fora do seu INR alvo, sob risco de sangramentos ou tromboembolismo, devido à dose supra ou subterapêutica. Em vista disso, estratégias que auxiliem na prescrição de uma dose mais adequada para cada paciente são importantes. A farmacogenética é uma ferramenta muito promissora para tal propósito, visto que estudos em diferentes populações vêm encontrando associação entre polimorfismos de genes do metabolismo e mecanismo de ação da varfarina e a dose.

Neste estudo, foi investigada a influência dos SNP's -1654 C>T no promotor do gene PROC e 1238G>A no éxon 8 do gene F7 sobre a variação da dose terapêutica da varfarina. Nossos resultados sugerem que esses polimorfismos não estão associados com a dose, não sendo importante sua inclusão em uma equação de predição de dose para a população do Rio Grande do Sul. Isso não descarta que outros polimorfismos nos mesmos genes desempenhem um papel importante na variação de dose da varfarina, já que as proteínas codificadas por eles estão indiretamente ligadas ao mecanismo de ação do anticoagulante. Assim sendo, estudos com outros polimorfismos desses genes podem conseguir explicar mais sobre a variação de dose da varfarina.

O uso de algoritmos com dados clínicos e genéticos não eliminará o monitoramento por INR, mas poderá prevenir hemorragias no início do tratamento (Gage *et al.*, 2004). Estudos farmacogenéticos são importantes para que se encontre o maior número de genes com influência na farmacodinâmica e farmacocinética do medicamento, e assim elaborar algoritmos mais precisos.

Considerando que a sensibilidade à varfarina é uma característica multifatorial, provavelmente há diversos fatores ainda não identificados que têm um efeito pequeno, de modo que a detecção deles torna-se mais difícil, principalmente quando analisados independentemente.

BIBLIOGRAFIA

Bernardi F, Arcieri P, Bertina RM, Chiarotti F, Corral J, Pinotti M, Prydz H, Samama M, Sandset PM, Strom R *et al.* (1997) Contribution of Factor VII Genotype to Activated FVII Levels. Differences in Genotype Frequencies Between Northern and Southern European Populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2548-2553.

Botton MR (2010) Farmacogenética da varfarina: proposta de um algoritmo para a predição de dose. Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Chan TY, Miu KY (2004) Hemorrhagic complications of anticoagulant therapy in Chinese patients. *J Chin Med Assoc* 67(2):55-62.

Dahlbäck B (1991) Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 12;66(1):49-61.

Dahlbäck B (2005) Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 257:209-223.

Dang MT, Hambleton J, Kayser SR (2005) The influence of ethnicity on warfarin dosage requirement. *Ann Pharmacother* 39(6):1008-12.

Fasco MJ, Hildebrandt EF, Suttie JW (1982) Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *J Biol Chem* 257:11210–11212.

Foster DC, Yoshitake S, Davie EW (1985) The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4673-4677.

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

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

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

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

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

Herman D, Peternel P, Stegnar M, Breskvar K, Dolzan V (2006) The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thromb Haemost* 95(5):782-7.

Heywood DM, Gerning ON, Grant PJ (1996) Association of factor VII:C levels with environmental and genetic factors in patients with ischaemic heart disease and coronary atheroma characterised by angiography. *Thromb Haemost.* 76(2):161-165.

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

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

Hoshi S, Hijikata M, Togashi Y, Aoyagi T, Kono C, Yamada Y, Amano H, Keicho N, Yamaguchi T (2007) Protein C deficiency in a family with thromboembolism and identified gene mutations. *Intern Med* 46(13):997-1003.

Huang H, Jia S, Chen S, Sha Y, Ma A, Ma X, Zhang J, Bai X, He L (2009) The coagulation factor VII gene polymorphisms in patients with myocardial infarction in Ningxia Hui and Han populations. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 26(6):653-8.

Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J, Miller G (1996) Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost* 75:567–572.

Junker R, Heinrich J, Schulte H, van de Loo J, Assmann G (1997) Coagulation factor VII and the risk of coronary heart disease in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(8):1539-44.

Kisiel W (1979) Human Plasma Protein C: Isolation, characterization, and mechanism of activation by α -thrombin. *J Clin Invest* 64(3): 761-769.

Krynetskiy E, McDonnell P (2007) Building individualized medicine: prevention of adverse reactions to warfarin therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 322(2):427-34.

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

Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, Agarwal A, Peter I, Doheny D, van der Zee S, Jaremko M, Yoo C, Desnick RJ, *et al.* (2010) Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. *J Thromb Haemost* 8(5):1018-26.

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

Nelsestuen GL (1976) Role of γ -carboxyglutamic acid: an unusual transition required for calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem* 251:5648–5656.

Ohno M, Yamamoto A, Ono A, Miura G, Funamoto M, Takemoto Y, Otsu K, Kouno Y, Tanabe T, Masunaga Y *et al.* (2009) Influence of clinical and genetic factors on warfarin dose requirements among Japanese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 65:1097–1103.

Owens JC, Neely WB, Owen WR (1962) Effect of sodium dextrothyroxine in patients receiving anticoagulants. *N Engl J Med* 266:76–79.

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

Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR (1986) Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 546-550.

Rapaport SI, Rao LV (1995) The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74(1):7-17.

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

Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard J S, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long G L, Poort S R, *et al.* (1995) Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb Haemost* 73:876-889.

Richards RK (1943) Influence of fever upon the action of 3,3-methylene bis-(4-hydroxycoumarin). *Science* 97:313–316.

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

Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. (2010) Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J Thromb Thrombolysis* (Publicado on line)

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

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

Spek CA, Poort SR, Bertina RM, Reitsma PH (1994) Determination of the allelic and haplotype frequencies of three polymorphisms in the promoter region of the human protein C gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2):309-311.

Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH (1995) Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:214-218.

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

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

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

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

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

Watala C, Golanski J, Kardas P (2003) Multivariate relationships between international normalized ratio and vitamin K-dependent coagulation-derived parameters in normal healthy donors and oral anticoagulant therapy patients. *Thrombosis journal* (1):7.

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

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

Yamada A, Wada H, Kamikura Y, Hiyoyama K, Shimura M, Nagaya S, Deguchi K, Mori Y, Shiku H (1996) Plasma levels of activated FVII in various diseases. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7(8):794-8.

FONTES DA INTERNET

National Center for Biotechnology Information SNP data base (NCBI SNPdb)

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799808
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6046