Leiliane Rodrigues Marcatto

**Avaliação farmacogenética para os genes *CYP2C9* e *VKORC1*
em pacientes usuários de varfarina e em indivíduos da
população geral brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima
Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marcatto, Leiliane Rodrigues

Avaliação farmacogenética para os genes CYP2C9 e VKORC1 em pacientes usuários de varfarina e em indivíduos da população geral brasileira / Leiliane Rodrigues Marcatto. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Paulo Caleb Júnior de Lima Santos.

Descritores: 1.Algoritmos 2.Citocromo P-450 CYP2C9 3.Proteína humana VKORC1 4.Varfarina 5.Farmacogenética 6.Anticoagulantes

USP/FM/DBD-442/16

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois Ele é a base para as minhas conquistas.

Aos meus pais Valdenir e Leila, aos meus irmãos Letícia e Leonardo e ao meu companheiro Paulo César, pelo apoio, paciência e por sempre estarem comigo.

À minha avó Yolanda por ter me ensinado o que é amor, saudade e por ter deixado a melhor parte dela em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Caleb

Agradeço por todas as oportunidades que me proporcionou, por todos os ensinamentos e dedicação. Obrigada por me fazer crescer tanto o lado profissional como pessoal. Você foi essencial por toda a minha jornada neste mestrado.

Aos meus pais, Valdenir e Leila

Não tenho palavras que possam expressar meus sentimentos, que dentro de dificuldades e felicidades, vocês sempre estiveram comigo. Cada um apoiando do seu jeito, demonstrando amor, carinho, sendo essencial para formar o ser humano que sou. Só tenho que agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Letícia e Leonardo

Le, obrigada por sempre estar ao meu lado, dando conselhos e me apoiando. Espero ser essencial nas suas conquistas assim como você é nas minhas. Leozinho, você, com certeza, foi uma pessoinha muito importante durante minha vida acadêmica. Você sempre estudou comigo e sempre opinou de forma brilhante nas minhas apresentações, apesar da pouca idade. Incrivelmente, você é o melhor presente que a mãe e o pai puderam me dar um dia. Obrigada por tudo. Te amo demais.

Ao meu companheiro e sua família, César, Rosângela e Paulo

César, você, com toda certeza, me tornou uma pessoa melhor desde que entrou em minha vida. Agradeço todo apoio durante o mestrado e por ter ouvido tanto sobre o

assunto sem reclamar. Te amo muito. Rosângela e Paulo, obrigada por todos os conselhos. Os seus olhares críticos foram essenciais para este trabalho.

À minha tia Zilda,

Não poderia deixar de te agradecer por ter proporcionado a oportunidade ao meu pai de viver melhor e continuar prestigiando minhas conquistas. Obrigada por ter sido sempre presente em minha vida e por vibrar por todas as minhas conquistas. Amo muito você e toda a sua família.

Aos meus amigos Carolina Tosin, Paula Fernanda, Paulo Roberto e Juliana

Obrigada por todos os conselhos, por todas as conversas, por ler, ver e corrigir tudo o que eu escrevo. Vocês foram essenciais para o meu trabalho.

Aos médicos amigos Dr. Francisco Darrieux e Dra. Luciana Sacilotto

Obrigada pela confiança e por todo apoio. É um prazer trabalhar com excelentes profissionais como vocês. Vocês são exemplos para mim.

A todos os pacientes participantes deste projeto

Agradeço imensamente a participação, sem vocês nada disso teria sentido.

Ao CNPq, à FAPESP e à Comissão Científica

Agradeço o apoio financeiro para a execução desse trabalho.

Não poderia faltar agradecer a todos os meus amigos: Aline Aranha, Clarice, Emanuelle, Mariana, Marina, Maurício, Gabriele, Pamela, Cínthia, Theo, Priscila por todo o apoio.

*"E guardemos a certeza, pelas próprias dificuldades
já superadas, que não há mal que dure para
sempre."*

Chico Xavier

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características farmacológicas da varfarina.....	2
1.1.1 Farmacocinética da varfarina.....	2
1.1.2 Farmacodinâmica da varfarina	3
1.2 Avaliação laboratorial no uso de varfarina.....	4
1.3 Qualidade da anticoagulação com varfarina.....	5
1.4 Fatores que podem alterar a dose de varfarina	6
1.4.1 Fatores fenotípicos.....	6
1.4.2 Fatores genéticos	6
1.5 Algoritmos farmacogenéticos e suas aplicabilidades	8
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Primário	14
3.2 Secundário	14
4 MÉTODOS.....	15
4.1 Casuística e desenho do estudo	15
4.2 Comitê de ética em pesquisa	16
4.3 Critérios de inclusão e exclusão	16
4.4 Aplicação de questionários.....	17

4.5 Fases de derivação, replicação e teste de desempenho do algoritmo estimador de dose de varfarina.....	17
4.6 Coleta de amostras biológicas	19
4.7 Mensurações dos eventos	19
4.8 Extração, avaliação do <i>DNA</i> genômico e genotipagem.....	20
4.8.1 Genotipagem e fenótipos metabólicos preditos de acordo com os polimorfismos nos genes <i>CYP2C9</i> e <i>VKORC1</i>	21
4.8.1.1 Desenho e seleção dos <i>primers</i>	22
4.8.1.2 Gradiente de temperatura dos <i>primers</i>	22
4.8.2 Restrição enzimática.....	23
4.9 Análise estatística	26
5 RESULTADOS	28
5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes.....	28
5.2 Frequências do polimorfismo no gene <i>VKORC1</i> e dos fenótipos metabólicos preditos da <i>CYP2C9</i>	28
5.3 Média da dose de varfarina, eventos adversos e frequências dos pacientes dentro da faixa terapêutica de acordo com os polimorfismos nos genes <i>CYP2C9</i> e na <i>VKORC1</i> .	30
5.4 Derivação do algoritmo farmacogenético estimador de dose para varfarina	32
5.5 Fase de replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina .	36
5.6 Fase de teste de desempenho do algoritmo	36
5.7 Frequências do polimorfismo no gene <i>VKORC1</i> e dos fenótipos metabólicos preditos da <i>CYP2C9</i> na população geral	41
6 DISCUSSÃO	43
6.1 Média da dose de varfarina e eventos adversos de acordo com os polimorfismos nos genes <i>CYP2C9</i> e <i>VKORC1</i>	43
6.2 Derivação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina	44
6.3 Replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina	46
6.4 Avaliação do <i>TTR</i>	47
6.5 Utilização de algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose	48
6.6 Limitações	49
7 CONCLUSÃO.....	50
8 ANEXO A- ESCORE <i>HAS-BLED</i>	51
9 REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A– Termo de consentimento livre e esclarecido	

APÊNDICE B – Questionário

APÊNDICE C

APÊNDICE D

APÊNDICE E

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
ALT	Alanina aminotransferase
AVK	Antagonista da vitamina K
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroides
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
cm	Centímetro
<i>CYP2C9*2</i>	Polimorfismos no gene codificado do citocromo P-450 na isoenzima 2C9
<i>CYP2C9*3</i>	Polimorfismos no gene codificado do citocromo P-450 na isoenzima 2C9
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleotídeos: dATP, dCTP, dGTP e dTTP
DP	Dose predita
DO	Dose observada
<i>EM</i>	<i>Extensive metabolizer</i> - metabolizador normal
<i>FDA</i>	Agência sanitária do governo americano que controla alimentos e fármacos - <i>Food and Drug Administration</i>
<i>HAS-BLED</i>	Escore de avaliação de sangramento

HC-FMUSP	Hospital das clínicas- faculdade de medicina da universidade de São Paulo
<i>HWE</i>	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
<i>IM</i>	<i>Intermediate metabolizer</i> - metabolizador intermediário
IMC	Índice de massa corporal
ISI	Índice de sensibilidade internacional
InCor	Instituto do coração, São Paulo – SP
<i>IWPC</i>	<i>The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium</i>
Kg	Quilograma
K₃EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
mg/dL	Miligrama por decilitro
Na₂EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NH₄Cl	Cloreto de amônio
NH₄HCO₃	Bicarbonato de amônio

nm	Nanômetro
ng/μL	Nanograma por microlitro
ng	Nanograma
OMS	Organização mundial da Saúde
ON	<i>Overnight</i> – período noturno de 12 horas
OR	<i>Odds ratio</i> - Taxa de risco
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	<i>Poor metabolizer</i> - Metabolizador lento
pmol/μL	Picomol por microlitro
RNI	Razão normalizada internacional
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TTR	Tempo dentro da faixa terapêutica
TP	Tempo de protrombina
TAE	Tampão formado com Tris, Acetato e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris-HCl	Tris e ácido clorídrico

U	Unidade de massa atômica
<i>VKORC1</i>	Gene do complexo da vitamina K epóxi redutase 1
°C	Graus célsius
μL	Microlitro
%	Porcentagem
±	Símbolo para mais ou menos
μmol/L	Micromol por litro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gene, troca de nucleotídeo, posição do aminoácido e éxon	21
Tabela 2 – Características demográficas, clínicas e genéticas dos pacientes incluídos no estudo da primeira e segunda coorte	28
Tabela 3 – Variáveis do algoritmo estimador de dose de varfarina em um modelo de regressão múltipla linear	32
Tabela 4 – “Diferença na dose semanal” entre a DO e a DP em uma análise prospectiva com pacientes em dose estável acompanhados por 1 ano (n=318)	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da varfarina	03
Figura 2 – Atividades fisiológicas da isoenzima <i>CYP2C9</i> e da vitamina K epóxido redutase no metabolismo da varfarina	08
Figura 3 – Fases de desenvolvimento do algoritmo	16
Figura 4- Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo <i>CYP2C9</i> *2 pós-restrição enzimática	24
Figura 5- Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo <i>CYP2C9</i> *3 pós-restrição enzimática	25
Figura 6- Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo <i>VKORC1</i> 3673 pós-restrição enzimática	25
Figura 7 – Dose de varfarina em pacientes com dose estável de acordo com os polimorfismos nos genes <i>CYP2C9</i> e <i>VKORC1</i> provenientes da primeira coorte (n=368)	30
Figura 8 – Histograma da distribuição de R^2 para os dois grupos de acordo com a análise de 10.000 randomizações	33
Figura 9 – Histograma de distribuições de variação de R^2 de acordo com a análise de 10,000 randomizações	33
Figura 10 – Correlação entre a dose predita e a dose observada pelo algoritmo desenvolvido na amostra de derivação	34

Figura 11 – Correlação entre a DP pelo algoritmo <i>IWPC</i> e a DP pelo algoritmo desenvolvido na amostra de derivação	35
Figura 12 – Correlação entre a DP e a DO (n=133) na amostra de replicação	37
Figura 13 – “Diferença na dose semanal” entre a DO e a DP em pacientes provenientes da primeira coorte	38
Figura 14 – Correlação entre a DP pelo algoritmo (www.warfarindosing.org) e a DP pelo algoritmo desenvolvido em pacientes com $RNI > 3,2$ e com $RNI < 1,8$	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos <i>primers</i> R e F desenhados pelo software <i>Primer 3</i> e suas respectivas temperaturas de anelamento	23
Quadro 2 - Descrição das enzimas de restrição enzimática e seus respectivos tampões para cada polimorfismo	24
Quadro 3 - Condições da corrida de eletroforese	24

RESUMO

Marcatto LR. *Avaliação farmacogenética para os genes CYP2C9 e VKORC1 em pacientes usuários de varfarina e em indivíduos da população geral brasileira*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A varfarina é o anticoagulante oral mais prescrito no mundo todo. Algoritmos farmacogenéticos têm sido desenvolvidos para estimar a dose de varfarina. Os principais objetivos deste estudo foram desenvolver um algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina e comparar o algoritmo desenvolvido neste trabalho com algoritmos disponíveis na literatura. Para atingir os objetivos foram incluídos dois grupos de pacientes tratados com varfarina (primeira coorte, n = 832; e segunda coorte, n = 133). Foram realizadas as genotipagens dos polimorfismos *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 e *VKORC1* (c.G1639A). A derivação do algoritmo foi realizada utilizando os dados dos pacientes da primeira coorte com dose estável (n=368) e foi replicado utilizando os dados dos pacientes provenientes da segunda coorte (n=133). Como resultado o algoritmo desenvolvido neste trabalho alcançou um coeficiente de determinação de 40%, incluindo as variáveis: idade, sexo, peso, altura, raça autodeclarada, uso de amiodarona, uso de indutores enzimáticos, os genótipos na *VKORC1* (c.G1639A) e os fenótipos de acordo com polimorfismos *CYP2C9*. Os dados sugerem que o nosso algoritmo desenvolvido é mais acurado do que o algoritmo *IWPC* (*The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*) quando a aplicação é focada em pacientes brasileiros. Os algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose de varfarina desenvolvidos para uma população específica podem ser mais efetivos para a terapia com varfarina em comparação com o uso de algoritmos estimadores de dose atualmente disponíveis.

Descritores: algoritmos; citocromo P-450 CYP2C9; proteína humana VKORC1; varfarina; farmacogenética; anticoagulantes.

ABSTRACT

Marcatto LR. *Pharmacogenetic evaluation for CYP2C9 and VKORC1 genes in patients that use warfarin and in the general Brazilian population*. [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Warfarin is the most prescribed oral anticoagulant in the world. Pharmacogenetic algorithms have been developed to estimate the dose of warfarin. The main aims of the present study were to develop a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and compare algorithm developed in this study with others algorithms available in the literature. We included two patient cohorts treated with warfarin (first cohort, n = 832; and second cohort, n = 133). Polymorphisms were genotyped in the *CYP2C9* * 2, *CYP2C9* * 3 and *VKORC1* (c.G1639A). The derivation of the algorithm was performed using the data from the patients in the first cohort with a stable dose (n = 368) and was replicated using data from patients from the second cohort (n = 133). Our algorithm achieved a determination of coefficient of 40%, including variables: age, sex, weight, height, self-declared race, use of amiodarone, use of enzymatic inducers, genotypes in *VKORC1* (c.G1639A) and phenotypes according to *CYP2C9* polymorphisms. Our data suggest that the developed algorithm is more accurate than the IWPC algorithm when the application is focused on patients from the Brazilian population. Pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithms developed for a specific population may lead to improved performance compared use dosing algorithms currently available

Descriptors: algorithms; cytochrome P-450 CYP2C9; VKORC1 protein, human; warfarin; pharmacogenetic; anticoagulants.

1 INTRODUÇÃO

A varfarina é o anticoagulante oral mais prescrito no mundo, utilizada para prevenção de trombose e terapia antitrombótica, por ser um medicamento conhecido há mais de 50 anos ^{1,2}.

Porém, este medicamento está associado com mortalidade e morbidade significativa, tornando-se a segunda principal causa de hospitalização emergencial relacionada com medicamento. A maioria dos eventos adversos surgem no início do tratamento com varfarina, sendo que o risco de ter quadros de hemorragia ou tromboembolismo varia entre 16% a 25% durante os primeiros 6 meses de tratamento ³⁻⁶.

Isto ocorre, porque a varfarina possui uma janela terapêutica estreita e uma grande variabilidade interindividual. Sua dose, geralmente, é escolhida de forma empírica e para atingir o alvo terapêutico varia entre 1 mg/dia a 20 mg/dia por indivíduo. Desta forma, são necessários métodos que melhorem a segurança e a efetividade da terapia com varfarina ^{7,8}.

Por vários anos, estes medicamentos AVK eram os únicos anticoagulantes orais existentes ⁹. Atualmente, também estão disponíveis no mercado novos anticoagulantes orais (NOACs), porém da mesma forma a varfarina continua ainda sendo a mais utilizada. Os NOACs possuem algumas vantagens como: rapidez no início e no fim do efeito anticoagulante, podendo assim, apresentar menor risco de intoxicação medicamentosa; geralmente, não é necessária a transição com heparina de baixo peso molecular; interação medicamentosa baixa; interação com alimentos não conhecida; entre outros. Porém, seu custo é muito elevado e não está disponível no Sistema Único

de Saúde (SUS), enquanto o custo da varfarina é extremamente baixo e está disponível no SUS. A varfarina é a única droga indicada para pacientes com estenose mitral, com prótese de válvula mecânica e com insuficiência renal (com clearance de creatinina <15 mL/min) e pode ser controlada e monitorada por exames laboratoriais enquanto que os NOACs não necessitam ser monitorados ¹⁰.

1.1 Características farmacológicas da varfarina

1.1.1 Farmacocinética da varfarina

A varfarina é composta por uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos, o R e o S. No qual, o enantiômero S é o mais potente, participando em aproximadamente 90% da farmacodinâmica do medicamento. A varfarina é rapidamente absorvida após sua administração oral pelo trato gastrointestinal, sofrendo redução na presença de alimentos, atingindo sua concentração máxima em torno de 90 minutos. Porém, devido ao seu mecanismo de ação, esse pico não coincide com o pico máximo do efeito farmacológico, que ocorre cerca de 40 horas após a sua administração, ligando-se fortemente à albumina plasmática ^{11, 12}.

A mistura racêmica da varfarina é acumulada no fígado, no qual, os dois enantiômeros são metabolicamente transformados por mecanismos diferentes. A S-varfarina é biotransformada para metabólitos inativos, aproximadamente 90% pela isoenzima CYP2C9 e em menor quantidade pela CYP3A4, enquanto que a R-varfarina é biotransformada, aproximadamente 60% pelas isoenzimas CYP1A2 e CYP3A4 e em menor quantidade pela isoenzima CYP2C19. Seus metabólitos inativos são excretados

na urina e nas fezes e sua meia-vida varia de 25 a 60 horas, com média de cerca de 40 horas. A duração de ação da varfarina é de 2 a 5 dias ^{9,13}.

1.1.2 Farmacodinâmica da varfarina

A varfarina é um antagonista da vitamina K. No ciclo, a vitamina K na sua forma reduzida é oxidada a epóxi vitamina K. Durante este processo, ocorre a carboxilação do ácido glutâmico para o ácido gamacarboxiglutâmico. Ativando os fatores de coagulação vitamina K dependentes e das proteínas S e C. Consequentemente, a vitamina K retorna à sua forma reduzida pela ação das redutases, fechando assim um ciclo.

A varfarina inibe a ação da vitamina K redutase e da vitamina K epóxi redutase, não havendo assim, a ativação dos fatores de coagulação vitamina K dependentes e das proteínas S e C (Figura 1) ¹¹.

Figura 1- Mecanismo de ação da varfarina. Na presença do fator vitamina K ocorre a carboxilação de resíduos do ácido glutâmico para formar o ácido gamacarboxiglutâmico que ativa os fatores de coagulação e das proteínas S e C. A varfarina inibe a ação das duas redutases, não havendo a ativação dos fatores de coagulação e das proteínas S e C. Fonte: Santos, 2016

1.2 Avaliação laboratorial no uso de varfarina

Por este medicamento apresentar uma faixa terapêutica estreita com difícil ajuste de dose é necessária a monitorização terapêutica laboratorial^{9, 11, 14}.

Esta monitoração laboratorial é realizada de acordo com o exame chamado tempo de protrombina (TP), que avalia os fatores de coagulação da via extrínseca e o fibrinogênio. Este teste é executado com a adição de cálcio no plasma descalcificado pelo citrato, em que a tromboplastina está presente. A tromboplastina converte a protrombina em trombina em um tempo uniforme e quando se adiciona o cálcio em uma quantidade de cloreto conhecida, ocorre a coagulação sanguínea em *vitro*. O tempo que leva para ocorrer a coagulação após a adição de cálcio é o chamado TP. A varfarina primeiramente reduz a ativação do fator VII e posteriormente a redução dos fatores X e II, obtendo um prolongamento do TP. Deste modo, a Organização mundial da Saúde (OMS) preconizou o uso do RNI que significa Razão Normalizada Internacional, para a avaliação adequada da terapia com varfarina^{9, 15, 16}. O RNI é o resultado da seguinte fórmula:

$$\text{RNI} = (\text{TP do paciente} / \text{TP de amostras controles})^{\text{ISI}}$$

No qual, ISI significa índice de sensibilidade internacional, que reflete a capacidade de resposta da tromboplastina para a redução dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K comparado com as preparações primárias de referência internacional da OMS, de modo que, quanto mais responsivo o reagente, menor o valor ISI. Cada fabricante do reagente fornece este número ao laboratório^{9, 15, 16}.

Deste modo, o RNI é utilizado na prática clínica de acordo com as diretrizes atuais para monitoração laboratorial da anticoagulação, tanto para atingir o nível terapêutico quanto para mantê-lo. O número de exames necessários irá depender da resposta do paciente ao tratamento. Para os pacientes que estão hospitalizados, a monitoração é realizada diariamente até se atingir um nível de segurança, que após, pode ser estendida para a realização de um novo exame, quando apresentar duas mensurações consecutivas com o valor de RNI dentro do intervalo terapêutico^{9, 15, 17}.

Além disso, para os pacientes ambulatoriais é recomendado por diretrizes, para os pacientes que estão iniciando o tratamento, a avaliação do RNI em até no máximo 15 dias até atingir o intervalo terapêutico. Uma vez atingido, a avaliação do RNI pode ocorrer de 4 até 12 semanas. Se o paciente apresentar um valor de RNI fora do intervalo terapêutico, é recomendado realizar o ajuste de dose e repetir o TP, que pode ser realizado diariamente ou em até 15 dias, a depender do valor e do risco do paciente apresentar sangramento ou embolia^{9, 15, 17}.

1.3 Qualidade da anticoagulação com varfarina

Além da monitoração da terapia com varfarina pelo RNI, também se utiliza o *TTR* (*Time in the therapeutic range*- tempo dentro da faixa terapêutica) que é um parâmetro a longo prazo da qualidade do tratamento com varfarina. O *TTR* basicamente mensura a porcentagem dos dias, de determinado período, em que valores de RNI estavam dentro do intervalo terapêutico. O *TTR* é calculado pelo método Rosendaal, que utiliza a interpolação linear dos valores de RNI. Clinicamente, valores menores de *TTR* têm sido associados a maiores riscos de eventos adversos, de sangramentos e de trombooses; e valores maiores de *TTR* têm sido associados a um menor risco de evento adverso e

maior efetividade terapêutica. Os pacientes que apresentam valores de *TTR* maior que 70% são considerados bem controlados pela anticoagulação com varfarina^{9, 18, 19}.

1.4 Fatores que podem alterar a dose de varfarina

Há diversos fatores fenotípicos e genéticos que podem alterar os valores de RNI e, consequentemente, a efetividade do tratamento com varfarina²⁰.

1.4.1 Fatores gerais

Os fatores gerais mais relacionados com a variabilidade à resposta da varfarina são: idade, índice de massa corporal (IMC), concomitância de medicamentos, como por exemplo, indutores enzimáticos, inibidores da bomba de prótons, inibidores enzimáticos como a amiodarona, estatinas, alterações na absorção, síntese e metabolização da vitamina K, não aderência ao tratamento, dieta, entre outros²¹⁻²³.

1.4.2 Fatores genéticos

Alguns estudos, demonstraram a associação entre a dose de varfarina e os polimorfismos no gene *CYP2C9* que codifica a isoenzima 2C9 e o *VKORC1*, complexo da vitamina K epóxi redutase 1. A *CYP2C9* é uma isoenzima responsável pela metabolização do enantiômetro S da varfarina e a enzima *VKORC1* reduz a vitamina K durante o processo de ativação dos fatores de coagulação vitamina K dependentes. A Figura 2 mostra a atividade fisiológica e a presença do polimorfismo da isoenzima *CYP2C9* e da enzima *VKORC1*²⁴⁻²⁶.

Para o gene *CYP2C9*, o genótipo selvagem é identificado como alelo *CYP2C9*1*. Além deste, o gene pode apresentar dois alelos variantes relativamente comuns, *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*, que acarretam diminuição da funcionalidade enzimática. A variante *CYP2C9*2* é caracterizada pela substituição Arg144Cys, em razão do polimorfismo c.C416T no éxon 3 do gene *CYP2C9*; e a variante *CYP2C9*3* é caracterizada pela substituição Ileu359Leu, decorrente do polimorfismo c.a1061T no éxon 7²⁷⁻²⁹.

O polimorfismo no gene *VKORC1* (c.G1639A) altera o fator de transcrição de ligação, levando a uma menor expressão da proteína. Este polimorfismo é encontrado em região promotora do cromossomo 16^{30, 31}.

Um estudo sobre a frequência destes genótipos na população brasileira mostrou que a frequência do alelo variante A e do genótipo homozigoto mutado para o *VKORC1* g.-1639G>A é maior em brancos do que em pardos e negros (50,5%; 32,9%; 46,0%, 28,8%; 39,3%, 22,2%; p<0,001), respectivamente. Para o *CYP2C9*2* o variante alelo foi maior em brancos (11,4%) do que em pardos (9,7%) e negros (8,5%). Para o polimorfismo *CYP2C9*3* não foi encontrada diferença significativa entre as etnias. Destacando assim, a necessidade de desenvolver um algoritmo estimador de dose em uma população miscigenada como a população brasileira³².

Pesquisas recentes revelam que aproximadamente 20% da população mundial são portadoras de pelo menos um alelo variante dos dois polimorfismos mais frequentes na isoenzima *CYP2C9*, que causam sensibilidade ao fármaco. A presença dos alelos variantes é mais comum entre os pacientes que requerem menores doses de varfarina comparada com aqueles que requerem doses usuais. Além disso, os pacientes que possuem os alelos variantes podem manifestar maior frequência de sangramento e de elevação no valor de RNI no início do tratamento. Os polimorfismos nos genes *CYP2C9*

e *VKORC1* podem explicar 54% da variabilidade da dose de varfarina, e reduzir em 43% o risco de hospitalização por sangramentos ou eventos tromboembólicos em pacientes no início do tratamento com varfarina^{26, 33-37}.

Deste modo, é indicado que os polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1* são úteis na estimativa da dose inicial da varfarina e a genotipagem pode se tornar mais comum na avaliação inicial dos pacientes.

Fonte: Santos, 2013

Figura 2- Atividades fisiológicas da isoenzima CYP2C9 e da vitamina K epóxido redutase no metabolismo da varfarina. O fármaco ativo é biotransformado pela isoenzima CYP2C9 a metabólito inativo, quando há a presença do polimorfismo de perda de função enzimática acarreta a maior concentração de fármaco ativo na corrente sanguínea. O fármaco reduz a ação da vitamina K epóxido redutase que é essencial para a ativação dos fatores de coagulação vitamina K dependentes. O polimorfismo no gene *VKORC1* geralmente resulta em uma maior resposta ao fármaco, exigindo assim, menores doses.

1.5 Algoritmos farmacogenéticos e suas aplicabilidades

Vários estudos correlacionaram a presença dos polimorfismos com a alteração na dose de varfarina em grupos selecionados de pacientes.

Nosso grupo acompanhou a anticoagulação de 206 pacientes durante o período de 360 dias e diferenças significativas na dosagem de varfarina foram observadas quando os grupos foram estratificados por genótipo e por tempo de acompanhamento, 7-10, 30, 60, 180 e 360 dias. Além disso, observou-se que a variabilidade das dosagens de varfarina, realizadas pelos médicos durante as consultas, foram diferentes para os grupos de pacientes a curto e a longo prazo ²⁶. Furuya e colaboradores estudaram 94 pacientes ingleses em manutenção da anticoagulação com varfarina. A dose semanal do anticoagulante foi menor para os pacientes heterozigotos para a variante *CYP2C9*2* (P valor=0,02) e nove dos dez pacientes com doses menores que 15 mg/semana eram heterozigotos para *CYP2C9*2* ³⁸. Ozer e colaboradores avaliaram a anticoagulação de 70 pacientes da Turquia e puderam observar que, pacientes com genótipo selvagem (*1/*1) para *CYP2C9* necessitavam de doses diárias maiores ($4,74 \pm 2,49$) que os pacientes heterozigotos para a variante *CYP2C9*2* (*1/*2) ($3,71 \pm 1,76$) e os pacientes heterozigotos para *CYP2C9*3* (*1/*3) e os homozigotos compostos (*2/*3) necessitavam de doses menores ($3,32 \pm 1,92$, P valor=0,017) ³⁹.

Baseado nos resultados disponíveis na literatura sobre a relação entre a dose do medicamento e as informações genéticas dos pacientes, o FDA (*Food and Drug Administration*) adicionou em 2007 informações sobre os efeitos farmacogenéticos do produto na bula, especialmente em relação aos polimorfismos *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3* e *VKORC1* 1639 G>A. Estas informações de dose de acordo com os genótipos podem ser utilizadas pelo corpo clínico no momento de decisão da dose ⁴⁰. Porém, Finkelman e seus colaboradores mostraram que a predição de dose de varfarina foi significativamente melhor com o algoritmo farmacogenético (52%) em relação ao método empírico (37%),

o algoritmo clínico (39%) e a tabela disponível na bula da varfarina pelo FDA (43%) ($P < 0,001$). Concluindo, a tabela genética para predição de dose de varfarina é melhor que o método empírico, porém, o algoritmo farmacogenético é melhor que todos os outros métodos ⁴¹.

Desde então, algoritmos farmacogenéticos tem sido propostos na literatura, com a intenção de melhorar a terapia com varfarina, atingindo mais rapidamente o alvo terapêutico e obtendo vantagens por conter informações clínicas, uso de medicação e informações genéticas ⁴².

Quanto à construção de algoritmos estimadores de dose de varfarina, Botton e colaboradores desenvolveram um algoritmo estimador de dose incluindo dados genéticos, clínicos e farmacológicos, explicando assim 63,3% da variação de dose do anticoagulante ⁴³. Também, Perini e colaboradores construíram um algoritmo que respondeu 51% da variação da dose semanal de varfarina para 390 pacientes brasileiros ⁴⁴. Verde e colaboradores desenvolveram um método de algoritmo para um grupo de 193 pacientes espanhóis. Ainda, houve evidências baseadas no algoritmo desenvolvido com os dados de variantes nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*, de que pacientes portadores do genótipo homozigotos para *CYP2C9**2 necessitaram das menores doses, os heterozigotos de doses intermediárias, enquanto os de genótipo selvagem, de doses maiores ⁴⁵.

Além disso, o algoritmo disponível internacionalmente na internet e por enquanto o mais utilizado é o *IWPC* (*International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*-Consortio internacional da farmacogenética da varfarina). Este algoritmo foi desenvolvido em 2009, incluiu 4043 pacientes e foi validado utilizando dados de 1009 pacientes de 9 países diferentes, 4 continentes diferentes, incluindo as variáveis

genéticas *VKORC1* (c.G1639A), *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*. E variáveis clínicas como idade, IMC, entre outras ⁴⁶.

No entanto, ainda não se sabe se a terapia com varfarina guiada pelo genótipo melhora a farmacoterapia e se realmente esta prática é custo-efetiva. No entanto, alguns estudos têm mostrado que o uso de algoritmos tem diminuído o tempo para atingir a faixa terapêutica e melhorado a qualidade de vida dos pacientes ^{35, 47-50}.

Jeffrey e colaboradores observaram, em 206 pacientes, que o uso de algoritmo estimador de dose apresenta melhor desempenho para atingir a dose estável do anticoagulante, resultando em menor manejo da dose ³⁵. McMillin e colaboradores compararam a eficiência da anticoagulação com dose de varfarina baseada no genótipo versus a anticoagulação padrão. Eles observaram redução na incidência de eventos adversos em 229 pacientes ⁴⁹. Anderson e colaboradores propuseram um teste clínico randomizado comparando um algoritmo farmacogenético com a prática clínica em 504 pacientes, com acompanhamento de 3 meses. O grupo usando o algoritmo foi superior aos controles (percentagem do RNI fora do alvo 31% versus 42% no 1º mês, 30% versus 42% em 3 meses, todos com $P < 0,001$), sugerindo sua aplicação clínica ⁵¹.

Pirmohamed e seus colaboradores, acompanharam por 12 semanas pacientes recrutados no Reino Unido e na Suécia. Eles identificaram que a porcentagem média do *TTR* foi maior no grupo guiado pelo genótipo (67,4%) comparado com o grupo controle (60,3%, $P < 0,001$). Utilizando uma versão modificada do algoritmo *IWPC* ⁵².

Verhoef e seus colaboradores estudaram pacientes que faziam uso de acenocumarol ou fenprocumona recrutados na Holanda e na Grécia. Eles identificaram que o grupo guiado pelo genótipo não melhorou o *TTR* durante as primeiras 12 semanas após o início da terapia (61,6 e 60,2%; $P = 0,52$). Porém, eles identificaram diferentes valores de *TTR* durante as primeiras 4 semanas após o início do tratamento no grupo

farmacogenético e no grupo controle (52,8% e 47,5%; $P=0.02$), utilizando um algoritmo desenvolvido pelo próprio grupo ⁵³.

Por último, Kimmel e seus colaboradores, estudaram pacientes de 18 centros clínicos distintos nos EUA, concluindo que o grupo guiado pelo genótipo para decisão de dose de varfarina não melhorou o controle da anticoagulação durante as primeiras 4 semanas de terapia comparado ao grupo controle (45,2% e 45,4; $P=0,91$), utilizando um algoritmo desenvolvido pelo próprio grupo ⁵⁴.

No entanto, pela alta miscigenação encontrada no Brasil, é recomendado o desenvolvimento de um algoritmo farmacogenético para a população específica, no intuito de ser mais efetivo do que os algoritmos desenvolvidos para outras populações

2 JUSTIFICATIVA

A varfarina apresenta uma faixa terapêutica estreita podendo ocorrer eventos adversos graves, como sangramentos ou eventos tromboembólicos. Deste modo, são necessários estudos que investiguem de forma mais específica a escolha de dose de varfarina, podendo assim, diminuir os riscos deste tratamento.

A literatura mostra que os pacientes portadores do genótipo homozigoto mutado para as variáveis genéticas *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3* e *VKORC1* (c.G1639A) possuem menor dose de varfarina que os pacientes portadores do genótipo selvagem. Dessa forma, alguns estudos desenvolveram algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose de varfarina para tentar proporcionar um tratamento personalizado para o paciente. No entanto, esses algoritmos foram criados para sua população específica, o que não condiz com a população brasileira, que é altamente miscigenada, diferenciando-se da população europeia e americana.

Neste contexto, a contribuição deste estudo é o desenvolvimento de um algoritmo farmacogenético estimador de dose para varfarina em população específica. Nossos resultados poderão proporcionar um algoritmo farmacogenético para os pacientes brasileiros, podendo futuramente ser utilizado e possivelmente melhorar a terapia com varfarina, garantindo seus benefícios e superando assim, os seus riscos.

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Desenvolver um algoritmo farmacogenético estimador de dose para varfarina em uma população específica.

3.2 Secundário

Comparar o algoritmo desenvolvido neste estudo com algoritmos disponíveis na literatura.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística e desenho do estudo

Este é um estudo transversal que incluiu duas coortes de pacientes tratados com varfarina provenientes do Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os pacientes foram incluídos em dois períodos distintos (primeira e segunda coorte). Foram incluídos 832 pacientes na primeira coorte no período de setembro de 2011 a março de 2012. Os pacientes provenientes da segunda coorte (n=133) foram recrutados de janeiro a fevereiro de 2014.

O estudo foi composto por diversas fases, que estão descritas na Figura 3. A fase de derivação foi a fase de desenvolvimento do algoritmo incluindo 368 pacientes com dose estável de varfarina provenientes da primeira coorte, chamando assim de amostra de derivação. Na fase de replicação foram utilizados os dados dos pacientes com dose estável provenientes da segunda coorte. Ainda, foi realizada a fase de teste de desempenho para a finalização do algoritmo, realizando o teste de corte transversal em pacientes sem dose estável e uma análise prospectiva para testar a estabilidade da anticoagulação.

Figura 3- Fases de desenvolvimento do algoritmo. Na fase de derivação foram incluídos 368 pacientes com dose estável e na fase de replicação foram incluídos 133 pacientes com dose estável. E na fase de teste de desempenho do algoritmo final, foram realizadas mais duas análises. FONTE: Santos, 2015

4.2 Comitê de ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (nº 0804/10). Todos os pacientes incluídos foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos pacientes em tratamento com varfarina, com idade igual ou superior a 18 anos e com no mínimo 1 ano de uso do medicamento.

Foram excluídos do estudo pacientes com insuficiência hepática e/ou renal crônica, que faziam uso de outros medicamentos anticoagulantes ou antiplaquetários, que

receberam quimioterapia no momento da inclusão no estudo, etilistas ou aqueles que não fazem parte do critério de inclusão.

4.4 Aplicação de questionários

Foi aplicado um questionário no momento da inclusão do paciente no estudo (Apêndice B), em seu conteúdo foram registrados os dados como, peso, altura, gênero, se o paciente fuma, se ingere bebidas alcoólicas e suas respectivas quantidades, indicação para o tratamento com varfarina, se possui outras comorbidades, medicações, entre outras.

4.5 Fases de derivação, replicação e teste de desempenho do algoritmo estimador de dose de varfarina

A dose de varfarina foi determinada pelo corpo clínico que não obtinha conhecimento sobre os genótipos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*. O escore *HAS-BLED* foi utilizado para estimar o risco de sangramento na terapia com anticoagulação. O *HAS-BLED* é composto pelas variáveis: histórico de hipertensão não controlada (>160 mmHg), doença renal (diálise; transplantado; Creatinina $>2,26$ mg/dL ou >200 μ mol/L), doença hepática (cirrose ou bilirrubina $>2x$ o valor normal ou AST/ALT $>3x$ o valor normal), histórico de AVC, casos de sangramentos maiores ou predisposição a sangramentos, RNI não estável ($TTR <60\%$), idade >65 anos, uso de medicação que predispõe sangramentos (agentes antiplaquetários, AINES- antiinflamatórios não esteroidais) e histórico de uso de álcool (≥ 8 bebidas por semana); podendo totalizar 9 pontos, quanto maior a pontuação maior o risco de sangramento (Anexo A) ⁵⁶. Este

escore é essencial na decisão de dose prescrita para o paciente. Para pacientes que não tinham risco aumentado de sangramento foi prescrito 5 mg/dia de varfarina (35 mg/semana), enquanto que, para pacientes que obtinham um risco aumentado de sangramento foi prescrito 2,5 mg/dia de varfarina (17,5 mg/semana), realizando após se necessário o ajuste de dose.

A derivação do algoritmo foi feita utilizando dados dos pacientes provenientes da primeira coorte, que, no momento da inclusão, apresentaram dose estável de varfarina (n=368). Foi considerado como dose estável, quando o paciente apresentava os três últimos valores de RNI consecutivos dentro da faixa terapêutica entre 1,8 e 3,2.

O modelo de dose predita foi derivado da seguinte forma: primeiro, foi realizada uma análise para o modelo de regressão múltipla linear para selecionar as variáveis a serem incluídas no algoritmo. Uma seleção inicial foi baseada no algoritmo já existente chamado *IWPC*. O modelo foi selecionado de acordo com o coeficiente de determinação R^2 e o quanto cada covariável foi significativa para o modelo. Após, foram realizadas séries de permutações para definir o melhor e mais estável esquema para cada variável. Este foi desenvolvido dividindo a amostra em dois subgrupos aleatórios (276 e 92 indivíduos) e, em cada subgrupo, foram ajustadas as covariáveis pré-selecionadas pelo modelo de regressão múltipla linear. Os efeitos das covariáveis de interesse na manutenção de dose de varfarina, assim como, a qualidade do ajuste do modelo pelo R^2 , foram salvos para os dois modelos gerados (isto é, usando 276 e 92 indivíduos). A fim de verificar a estabilidade dos efeitos e ajustes, este processo foi repetido 10.000 vezes. Finalmente, o efeito médio de cada variável nas 10.000 permutações foi obtido e estes valores foram propostos no algoritmo final.

As amostras provenientes da segunda coorte em dose estável (n=133) foram chamadas de amostras de replicação. Estas foram utilizadas para a replicação do algoritmo derivado.

Na fase de teste de desempenho, foi formado um grupo de amostras de pacientes que não obtinham dose estável no período de inclusão da primeira coorte (n=464). Além disso, foi realizado um seguimento com pacientes em dose estável provenientes da primeira coorte (n=368). Eles foram acompanhados por um ano (n=318), estes indivíduos tiveram o *TTR* calculado e os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a média do *TTR* ($<0,73$ ou $\geq 0,73$) ou com a presença de todos os valores de RNIs dentro da faixa terapêutica durante o período de acompanhamento de um ano. Esta análise foi utilizada como representante da estabilidade da anticoagulação.

4.6 Coleta de amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue venoso em tubos contendo citrato de sódio 3,2% para a realização do exame TP e 2 mL em tubos de K₃EDTA para extração de DNA (*Deoxyribonucleic acid*- Ácido desoxirribonucleico) para análise genotípica.

4.7 Mensurações dos eventos

A terapia com varfarina foi avaliada pelo exame TP pelo método coagulométrico automatizado. O seguimento do RNI para o ajuste de dose foi decidido de acordo com o corpo clínico baseado em recomendações de diretrizes.

Após o resultado do RNI atual, os valores de RNIs antigos são visualizados e checados no prontuário médico eletrônico. O *TTR* foi calculado utilizando o método de

Rosendaal, no qual, utiliza a interpolação linear dos dados que atribui o valor de RNI a cada dia entre os sucessivos valores demonstrados.

Sangramentos maiores foram definidos principalmente como sangramentos fatais ou ameaçadores a vida, hemopericárdio com tamponamento cardíaco, sangramento intracranial, hipotensão severa ou choque hipovolêmico devido a sangramento e causas que necessitam de intervenção cirúrgica, com um declínio de $\geq 5,0$ g/dL de hemoglobina depois do ajuste com transfusão de hemácias. Sangramentos menores são classificados como qualquer sangramento que requer intervenção médica, porém não faz parte do critério de sangramentos maiores.

4.8 Extração, avaliação do *DNA* genômico e genotipagem

O *DNA* genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico, através do método de precipitação salina, segundo o protocolo descrito.

Oito mL de sangue foram transferidos para um tubo de 50 mL, foi adicionado tampão A (1mM NH_4HCO_3 , 144mM NH_4Cl), completando-se o volume final para 30 mL. A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e armazenada a 4°C por 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3.000 RPM (rotações por minuto). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi finalmente ressuspensão em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 2 mM Na_2EDTA pH 8), 200 μL de SDS 10%, 500 μL de tampão C (50 μL de SDS 10%, 2 μL de Na_2EDTA 0,5 M pH 8, 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 μL de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e mantido a 37°C por aproximadamente 12-18 horas. Após esse processo, adicionou-se 1 mL de solução D (6 M NaCl), a mistura foi agitada

vigorosamente em vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3.000 RPM. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. Com uma leve agitação, já pôde ser notada a precipitação do *DNA*, que foi retirado cuidadosamente e transferido para um criotubo de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O criotubo foi então centrifugado a 4°C por 15 minutos a 13.500 rpm; o etanol foi descartado e o sedimento (*DNA*) foi mantido à temperatura ambiente até a evaporação do etanol remanescente. Em seguida, este pellet foi ressuspensionado em 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Após a completa ressuspensão do pellet, diluíram-se 20 µL do material em 980 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) e a determinação da concentração do *DNA* foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A concentração final foi corrigida para 100 ng/µL, no tubo de estoque, e para 10 ng/µL, no tubo de uso.

4.8.1 Genotipagem e fenótipos metabólicos preditos de acordo com os polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*

A genotipagens dos polimorfismos *CYP2C9**2 (c.430C > T,), *CYP2C9**3 (c.1075A > C, rs1057910) e *VKORC1* 3673 (g.1639G > A, rs9923231) foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (*PCR- Polymerase Chain Reaction*) seguida por digestão com enzimas de restrição. A Tabela 1 apresenta os genes, a troca do nucleotídeo, a posição do aminoácido e o éxon dos polimorfismos. O controle de qualidade foi realizado repetindo 6% das amostras e foram identificados os mesmos resultados.

Tabela 1- Gene, troca do nucleotídeo, posição do aminoácido e éxon.

Gene	Troca do nucleotídeo	Posição do aminoácido	Éxon
<i>CYP2C9*2</i>	c.C455T	p.Arg144Cys	3
<i>CYP2C9*3</i>	c.A1100C	p.Ileu359Leu	7
<i>VKORC1 3673</i>	c.G1639A	Região promotora	-

4.8.1.1 Desenho e seleção dos *primers*

Os *primers* (ou iniciadores) para os polimorfismos genotipados pela metodologia de restrição enzimática (*CYP2C9*2*: rs1799853; *CYP2C9*3*: rs1057910; *VKORC1*: rs9923231) foram desenhados utilizando o programa disponível na internet *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

4.8.1.2 Gradiente de temperatura dos *primers*

Primeiramente, os *primers* liofilizados foram ressuspensos em 500µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1, mM EDTA pH 8), homogeneizados e mantidos em repouso por 24 horas; após, foi retirada uma alíquota para uso com concentração final de 5 pmol/µL de *primer*. Depois, foi realizada uma reação de *PCR* gradiente, a qual permitiu determinar a melhor temperatura de anelamento para cada par de *primer* trabalhado. A reação foi constituída de 0,4 µL de *DNA* genômico (20 ng), 2 µL de tampão (2mM MgCl², 200mM dNTPs), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,5 U de BioTaq Polimerase *DNA* (Bio-Química, Brasil) e água Mili-Q autoclavada completando o volume final para 10 µL. Foi realizada uma *PCR* gradiente com 35 ciclos nas seguintes condições:

desnaturação do *DNA* molde em 94°C por 120 s no primeiro ciclo, desnaturação em 94°C por 30 s, anelamento de 45°C a 65°C (em uma escala de 12 temperaturas) por 30 s, extensão de 72°C por 120 s. Foram realizadas 12 reações, uma para cada temperatura de anelamento testada; a amplificação foi confirmada em gel de agarose a 2%. Conforme a qualidade das bandas de *DNA* no gel de agarose foi definida a temperatura de melhor anelamento dos *primers*. O Quadro 1 mostra a descrição dos *primers* desenhados e suas respectivas temperaturas.

Quadro 1- Descrição dos *primers* R e F desenhados pelo software *Primer 3* e suas respectivas temperaturas de anelamento

Polimorfismos	<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	Temperatura de anelamento
<i>CYP2C9*2</i>	CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG	GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC	60,5°C
<i>CYP2C9*3</i>	AGGAAGAGATTGAACGTGTGA	TTGGCCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCCATGCA	53,4°C
<i>VKORC1</i>	CTCAAGTGATCCACCCACCT	GAGAGTTCCCAGAAGGGTAGGT	59,6°C

4.8.2 Restrição enzimática

A metodologia de restrição enzimática consiste em utilizar uma enzima de restrição que corta o *DNA* em locais específicos gerando um conjunto reprodutível de fragmentos de *DNA*. Para esta metodologia, primeiramente, foi realizada uma *PCR* convencional (2 µL de *DNA* genômico à 20ng/µL + 8 µL da mix: 2 µL de tampão de reação (MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200mM), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,5 U de BioTaq Polimerase *DNA* (Bio-Química, Brasil) com a temperatura já estabelecida para o par de *primer* trabalhado. Com o produto da *PCR* (10µL) confirmado em gel de

agarose 1%, adicionou-se 5µL de tampão, enzima e volume suficiente de água MILI-Q autoclavada para completar a reação e é encubada em estufa a 37°C, *ON* (*overnight*-noite inteira). As enzimas de restrição utilizadas para cada polimorfismo, assim como os seus respectivos tampões, e suas concentrações estão descritos no Quadro 2. No Quadro 3 está descrito as condições da corrida de eletroforese.

Após o período de incubação o produto da reação foi discriminado entre os três genótipos, selvagem, heterozigoto e homozigoto, em um gel de agarose a 2% para *CYP2C9*2*, 4% para *CYP2C9*3* e 4% para *VKORC1* 3673. As Figuras 4, 5 e 6 apresentam o esquema didático da discriminação genotípica para os polimorfismos.

Quadro 2- Descrição das enzimas de restrição enzimática e seus respectivos tampões para cada polimorfismo

Polimorfismos	Enzima de restrição	Tampão da enzima	Concentração da enzima	Concentração do tampão
<i>CYP2C9*2</i>	Sau 96 I	Tampão 4	4%	40%
<i>CYP2C9*3</i>	STY I	Tampão 3	4%	40%
<i>VKORC1</i> (c.G1639A)	MSP I	Tampão 4	4%	40%

Quadro 3- Condições da corrida de eletroforese

Polimorfismos	Gel de agarose	Voltagem (V)	Tempo (minutos)
<i>CYP2C9*2</i>	2%	80	120
<i>CYP2C9*3</i>	4%	80	120
<i>VKORC1</i> (c.G1639A)	4%	80	120

Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto
253 _____	253 _____	
179 _____	179 _____	
119 _____	119 _____	119 _____
74 _____	74 _____	

Figura 4- Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo *CYP2C9**2 pós-restrição enzimática.

Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto
137 _____	137 _____	
	104 _____	104 _____
	26 _____	26 _____

Figura 5 – Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo *CYP2C9**3 pós-restrição enzimática.

Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto
	289 _____	289 _____
226 _____	226 _____	
63 _____	63 _____	

Figura 6- Representação didática da discriminação genotípica para o polimorfismo *VKORC1* (c.G1639A) pós-restrição enzimática.

Os pacientes foram divididos em fenótipos metabólicos preditos distintos: metabolizadores normais (*EM: extensive metabolizer*: genótipo selvagem para os polimorfismos da *CYP2C9* - *1/*1), metabolizadores intermediários (*IM: intermediate metabolizer*: genótipo heterozigoto para os polimorfismos diminuidores da função da *CYP2C9* - *1/*2 ou *1/*3) e metabolizadores lentos (*PM: poor metabolizer*:

homozigoto mutado ou genótipos heterozigotos compostos para os polimorfismos diminuidores da função da *CYP2C9* - *2/*2 ou *3/*3 ou *2/*3).

4.9 Análise estatística

As variáveis categóricas estão presentes como frequência, enquanto as variáveis contínuas estão presentes como média $\pm$ desvio padrão ou erro padrão da média. O teste Qui-quadrado de *Pearson* foi realizado para a análise comparativa das variáveis categóricas (como os eventos adversos, e o cálculo de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) de acordo com o polimorfismo. O teste t de *Student* foi utilizado para comparar a diferença entre a dose predita (DP), a dose observada (DO) e a ‘diferença na dose semanal’ entre a DP e a DO; para comparar a dose de varfarina, e o *TTR* de acordo com os fenótipos metabólicos preditos devido aos polimorfismos da *CYP2C9*. O teste ANOVA (análise de variância) foi utilizado para a análise da dose de varfarina e o *TTR* de acordo com os genótipos da *VKORC1*. O teste *Tukey's post hoc* foi realizado para identificar diferentes grupos. A média de dose de varfarina foi ajustada pela idade, gênero, índice de massa corporal (IMC) e raça/cor autodeclarada pelo modelo de regressão múltipla linear. O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para identificar as variáveis associadas com sangramentos maiores e menores. A correlação de *Pearson* foi realizada para avaliar a correlação entre a DO e a DP. No modelo de regressão linear múltipla, as seguintes variáveis foram incluídas: idade (anos), gênero, peso (kg), altura (cm), raça/cor autodeclarada, uso de amiodarona, uso de indutores enzimáticos, genótipos *VKORC1* e fenótipos metabólicos preditos devido aos polimorfismos *CYP2C9* (*EM*, *IM*, *PM*). O nível de significância considerado foi de $P \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas

foram realizadas utilizando o software SPSS (v. 16,0) e o programa estatístico computacional R (r-project.org/).

RESULTADOS

5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes

A Tabela 2 mostra a comparação entre as características clínicas e demográficas dos pacientes provenientes da primeira (n=832) e da segunda coorte (n=133). Dos pacientes provenientes da primeira coorte (média de idade 63 ± 14 anos), 417 (50,1%) eram do sexo feminino e predominantemente brancos (68,7%), possuindo somente 20,6% de pardos e 8,1% de negros. As principais indicações para o tratamento com varfarina foram para fibrilação atrial, acidente vascular cerebral prévio, trombose ou embolia e presença de prótese valvar do coração, excluindo pacientes com válvula mecânica, por requererem tratamento com anticoagulação cronicamente, obtendo assim, uma faixa terapêutica prescrita diferente. Não houve diferença significativa nos resultados das características clínicas e demográficas entre as coortes, somente a raça foi encontrada uma maior frequência de brancos na primeira coorte (68,7%) do que na segunda coorte (56,4%) e também foi encontrado um número maior de negros na segunda coorte (17,3%) (para ambos, P valor= 0,01).

5.2 Frequências do polimorfismo no gene *VKORC1* e dos fenótipos metabólicos preditos da *CYP2C9*

A Tabela 2 resume a frequência dos genótipos e dos fenótipos metabólicos preditos dos pacientes provenientes da primeira e da segunda coorte. A frequência do alelo variante A e do genótipo homozigoto mutado para o *VKORC1* g.1639G>A foi de 32,5%

e 12,3%, respectivamente e as frequências dos genótipos entre a primeira e segunda coorte não foi diferente estatisticamente (P valor =0,06). A frequência do alelo variante da *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 foram de 10,8% e 4,6%, respectivamente. As frequências dos fenótipos metabólicos preditos foram: 73,4% para *EM*, 22,5% para *IM* e 4,1% para *PM* na primeira coorte. As frequências dos genótipos entre a primeira e segunda coorte para a *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 não foi diferente estatisticamente (P valor =0,68). A distribuição dos genótipos para os polimorfismos *VKORC1* g.1639 G > A e *CYP2C9* não estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*HWE*), provavelmente por causa da significância da estrutura genética deste locus na população brasileira, que já foi reportado previamente pelo estudo sobre a diferente distribuição da população brasileira de acordo com a etnia autodeclarada e a ancestralidade genética ³².

Tabela 2- Características demográficas, clínicas e genéticas dos pacientes incluídos no estudo da primeira e segunda coorte.

Variáveis	Primeira coorte n=832 (100%)	Segunda coorte n=133 (100%)	P valor
Gênero, feminino (%)	50,1	43,6	0,20
Idade (anos)	63 ± 14	63 ± 17	0,67
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 5	26 ± 4	0,80
Raça/Cor (%)			
Branco	68,7	56,4	
Pardo	20,6	23,3	
Negro	8,1	17,3	0,01
Outros*	2,6	3,0	
Fumante (%)	5,7	3,0	
Indicação do tratamento (%)			
Fibrilação atrial	59,3	63,2	
Acidente cerebrovascular	12,8	9,0	
Trombose ou embolia	6,3	6,0	0,39
Prótese valvar do coração	13,5	15,8	
Outros	8,1	6,0	
<i>VKORC1</i> 1639 G>A (%)			
GG	47,2	38,4	
GA	40,5	54,1	0,06
AA	12,3	7,5	

Fenótipos metabólicos preditos** (%)			
<i>EM</i> (*1/*1)	73,4	75,2	
<i>IM</i> (*1/*2 ou *1/*3)	22,5	21,8	0,68
<i>PM</i> (*2/*2, *3/*3 ou *2/*3)	4,1	3,0	

*Outros significam Ameríndios e Asiáticos. ***CYP2C9**2, c.430C>T (rs1799853), *CYP2C9**3, c.1075A>C (rs1057910). *EM*: metabolizador normal; *IM*: metabolizador intermediário; *PM*: metabolizador lento.

5.3 Média da dose de varfarina, eventos adversos e frequências dos pacientes dentro da faixa terapêutica de acordo com os polimorfismos nos genes *CYP2C9* e na *VKORC1*

No grupo proveniente da primeira coorte (n=832), foi observado que a média da dose de varfarina foi significativamente menor em pacientes que possuem o fenótipo metabólico predito *IM+PM* ($25,8 \pm 0,8$ mg/semana) comparada aos pacientes que possuem o fenótipo metabólico predito *EM* ($29,7 \pm 0,5$ mg/semana) ($P < 0,001$). Para o polimorfismo no *VKORC1*, pacientes que possuem o genótipo GG apresentaram uma maior média de dose de varfarina ($32,3 \pm 0,6$ mg/semana) comparados aos pacientes que possuem o genótipo AA ($21,5 \pm 1,2$ mg/semana). Todos os pacientes utilizavam varfarina por pelo menos um ano antes da inclusão no estudo e a média do tempo de anticoagulação dos pacientes incluídos no estudo foi de $6,1 \pm 5,2$ anos.

Destes pacientes, foram selecionados os que possuíam dose estável de varfarina formando o grupo de amostras de derivação (n= 368, 44,2%). A Figura 7 mostra que a dose de varfarina foi significativamente diferente de acordo com o polimorfismo apresentado nos pacientes provenientes da amostra de derivação (n=368), mesmo depois de ajustada pelas covariáveis (idade, gênero, raça/cor auto declarada e IMC). Entre os fenótipos metabólicos *EM* e *IM+PM* obteve diferença significativa, mostrando que o fenótipo metabólico *EM* possui uma média de dose maior que os fenótipos metabólicos

IM+PM (29,6 versus 26,4, P valor=0,02). Para o gene *VKORC1* o genótipo selvagem (GG), estatisticamente, obteve uma dose maior que os genótipos GA e AA ($P<0.001$). Porém, não houve diferença estatística entre os genótipos GA e AA. Demonstrando que aqueles que possuem o genótipo GG necessitam de uma maior dose do que aqueles que possuem os genótipos GA e AA.

Figura 7- Dose de varfarina em pacientes com dose estável de acordo com os polimorfismos *CYP2C9* e *VKORC1* provenientes da primeira corte (n= 368). Polimorfismos *CYP2C9**2 c.C445T (rs1799853), *CYP2C9**3 c.A1100C (rs1057910), e *VKORC1* c.G1639A (rs9923231). *EM*, n= 269; *IM+PM*, n= 99. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Valores para os genótipos *VKORC1* (GG, n= 174; GA, n= 151; AA, n= 43) com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (teste *Tukey's post hoc*). Os dados foram ajustados para idade, gênero, índice de massa corporal, e raça. Dose estável de varfarina significa os três valores consecutivos de RNI entre 1,8 e 3,2 (incluindo o último teste).

Além disso, foi observado que os valores de *TTR* e a frequência dos pacientes em dose estável no grupo total (832) não foram diferentes entre os pacientes que possuem o fenótipo metabólico predito *EM* (61,4% ± 24,5% e 44,8%, respectivamente) e os pacientes que possuem o fenótipo metabólico predito *IM+PM* (62,0 ± 23,7% e 44%, respectivamente) (P valor= 0,78 e P valor= 0,84, respectivamente). Também para os

genótipos do *VKORC1*, o *TTR* e a frequência dos pacientes dentro da faixa terapêutica não apresentaram diferenças significativas.

Em relação aos eventos adversos, a frequência da história prévia de sangramentos maiores não foi diferente de acordo com os genótipos. No entanto, a frequência da história prévia dos sangramentos menores foi maior nos pacientes que possuem o fenótipo metabólico predito *IM+PM* (55,7%) comparado aos pacientes *EM* (45,0%; $p=0,007$). Na análise de regressão logística multivariada, o *IM + PM* foi associado com sangramentos menores (*OR*: 1,49, 95% *IC*: 1,07-2,08; *P* valor=0,02), em um modelo incluindo as covariáveis idade, gênero, raça/cor auto declarada, IMC, uso de amiodarona, uso de indutores enzimáticos, e os genótipos da *VKORC1*. Foi observada ainda, uma menor frequência de sangramentos menores em pacientes que possuem o genótipo GG para o polimorfismo no gene *VKORC1* (GG: 43,5%, GA:52,2%, AA:50,0%; *P* valor= 0,06).

5.4 Derivação do algoritmo farmacogenético estimador de dose para varfarina

A tabela 3 mostra o modelo final do algoritmo desenvolvido. O modelo foi desenvolvido com 368 pacientes em dose estável (amostra de derivação). A construção do modelo atingiu um R^2 múltiplo de 40% incluindo nove variáveis. Estas variáveis são: idade, gênero, peso, altura, raça/cor autodeclarada, uso de amiodarona, uso de indutores enzimáticos, os genótipos do gene *VKORC1* e os fenótipos metabólicos do polimorfismo no *CYP2C9*. Analisando o impacto das variáveis no algoritmo, as variáveis: idade, gênero feminino, o uso de amiodarona, a presença do alelo variante da *VKORC1* e a presença dos fenótipos preditos metabólicos *IM+PM*, tendem a diminuir a

dose de varfarina. Enquanto que, as variáveis: uso de indutores enzimáticos, raça/cor autodeclarada, peso e altura tendem a aumentar a dose de varfarina.

Tabela 3- Variáveis do algoritmo estimador de dose de varfarina em um modelo de regressão múltipla linear.

Variáveis	Coefficiente β (desvio padrão)	95% IC
Idade	-0,16 (0,03)	-0,16, -0,15
Gênero	-1,65 (0,80)	-1,66, -1,63
Peso	0,15 (0,02)	0,15, 0,15
Altura	0,08 (0,06)	0,07, 0,08
“Raça/cor”	0,36 (0,61)	0,34, 0,37
Uso de amiodarona	-7,34 (0,87)	-7,35, -7,31
Uso de indutores enzimáticos	22,42 (6,41)	22,29, 22,55
Genótipos <i>VKORC1</i>	-6,68 (0,53)	-6,69, -6,67
Polimorfismos <i>CYP2C9</i>	-2,52 (0,75)	-2,53, -2,50

Características das variáveis: idade (anos); gênero (1, se masculino, feminino 0); peso (Kg); altura (cm); “raça/cor” (autodeclarada como Branco, Pardo ou Negro – 1, 2 e 3, respectivamente); uso de amiodarona (1, se o paciente faz uso, não faz uso 0); uso de indutores enzimáticos (1, se o paciente faz uso, não faz uso 0); genótipos da *VKORC1* (GG, GA, ou AA - 0, 1 e 2, respectivamente); e os fenótipos preditos de acordo com o polimorfismo *CYP2C9* (*EM*, *IM*, ou *PM* - 0, 1 e 2, respectivamente). Polimorfismos *CYP2C9**2, c.430C>T (rs1799853), *CYP2C9**3, c.1075A>C (rs1057910), e *VKORC1* g.1639G>A (rs9923231).

No entanto, a inclusão das variáveis como uso de estatina, inibidores da bomba de prótons, indicação para tratamento e o uso de cigarro, não melhorou o desempenho do algoritmo, assim como, estas variáveis não demonstraram valores P significativos no modelo de regressão linear simples e múltipla. Os medicamentos carbamazepina e a fenitoína foram considerados como indutores enzimáticos da CYP na análise.

Além disso, também foi realizado um histograma de distribuição da R^2 para a amostra de derivação (n=368) dividida em dois grupos ($3/4= 276$ e $1/4= 92$) (Figura 8). Este histograma (painel A) mostra que em uma frequência de 2500 randomizações, em outras palavras, repetições de análise, foi atingida uma média de coeficiente de

determinação de 35%. A fim de verificar sua reprodução, foi testado também em um grupo menor (painel B), não demonstrando diferença estatística entre os painéis e sim, demonstrando a estabilidade do algoritmo. Também, a Figura 9 mostra um histograma da distribuição da variação do R^2 .

Figura 8- Histogramas da distribuição de R^2 para os dois grupos de acordo com a análise de 10.000 randomizações. Painel A: $n=276$, e Painel B: $n=92$.

Figura 9- Histograma de distribuições de variação de R^2 de acordo com a análise de 10,000 randomizações.

Ainda, foi realizada uma análise de correlação na amostra de derivação (n=368), ou seja, na fase de desenvolvimento do algoritmo. A Figura 10 mostra uma correlação moderada entre a DP e a DO ($r^2=0,51$, $P<0,001$) na predição de dose do algoritmo desenvolvido, mostrando que o algoritmo apresenta uma predição de dose parecida com aquela observada nos pacientes que possuem dose estável.

A Figura 11 mostra uma forte correlação entre a DP pelo algoritmo desenvolvido e a DP pelo algoritmo *IWPC* ($r^2=0,87$, $P<0,001$) nos pacientes provenientes da primeira coorte com dose estável (n=368), sugerindo que o algoritmo desenvolvido neste trabalho prediz uma dose de varfarina aproximada com a DP pelo algoritmo *IWPC*, que no momento, é o mais utilizado na prática clínica internacionalmente.

Figura 10- Correlação entre a DP e a DO pelo algoritmo desenvolvido na amostra de derivação. (n=368, $r^2=0.51$, $P<0.001$). Dose estável de varfarina significa os três valores consecutivos de RNI entre 1,8 e 3,2 (incluindo o último teste).

Figura 11- Correlação entre a dose predita pelo algoritmo *IWPC* e a dose predita pelo algoritmo desenvolvido na amostra de derivação. ($n= 368$, $r^2=0,87$, $P<0,001$). Dose estável significa os últimos três valores de RNI entre 1,8 e 3,2 (incluindo a mensuração mais atual).

5.5 Fase de replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina

A Figura 12 mostra a correlação entre a DP e a DO na amostra de replicação ($n=133$). Quando comparada à correlação entre a DP e a DO no algoritmo desenvolvido e a mesma correlação nos algoritmos *IWPC*, e nos outros dois algoritmos desenvolvidos no Brasil: Botton's e Perini's. Observa-se uma menor dispersão nos dados da correlação no algoritmo desenvolvido neste trabalho, mostrando assim, uma maior correlação do algoritmo desenvolvido (0,61) comparado com os algoritmos *IWPC*, Botton's e Perini's (0,51, 0,32 e 0,49, respectivamente).

5.6 Fase de teste de desempenho do algoritmo

A Figura 13 mostra a “diferença na dose semanal” entre a DO e a DP pelo algoritmo desenvolvido neste estudo e pelo algoritmo *IWPC* nos pacientes provenientes da primeira coorte. A “diferença na dose semanal” entre DO e a DP foi menor utilizando o algoritmo desenvolvido neste estudo comparado com o algoritmo *IWPC* ($0,5 \pm 0,6$ mg/semana versus $-3,5 \pm 0,6$; $P < 0,001$, respectivamente) na amostra de derivação. Este resultado mostra que o *IWPC* possui uma maior variação da dose semanal do que o algoritmo desenvolvido neste trabalho. Foi também observado um achado significativo na ‘diferença na dose semanal’ para os pacientes com $RNI > 3,2$ ou $RNI < 1,8$, visto que em ambos o *IWPC* possui uma maior variação, quando comparado com o algoritmo desenvolvido neste trabalho (Figura 13).

Apesar de o *IWPC* possuir uma maior variação na dose semanal, o algoritmo desenvolvido neste trabalho demonstra uma tendência de aumento na variação da dose semanal, enquanto que o algoritmo *IWPC* demonstra uma tendência de diminuição na variação da dose semanal.

Figura 12- Correlação entre a DP e a DO (n=133) na amostra de replicação. **(A)** Dose predita (DP) pelo algoritmo desenvolvido ($r^2 = 0,61$, $P < 0,001$), **(B)** DP pelo algoritmo *IWPC* ($r^2 = 0,51$, $P < 0,001$) **(C)** DP pelo algoritmo de Botton's ($r^2 = 0,32$, $P < 0,001$), e **(D)** DP pelo algoritmo de Perini's ($r^2 = 0,49$, $P < 0,001$).

Figura 13- “Diferença na dose semanal” entre a DO e a DP em pacientes provenientes da primeira coorte. Grupo 1: DP pelo algoritmo desenvolvido. Grupo 2: DP pelo algoritmo IWPC.

Painel A: pacientes com dose estável.

Painel B: pacientes com RNI > 3.2.

Painel C: pacientes com RNI < 1.8.

“Diferença na dose semanal” foi calculada subtraindo a DP pela OD.

Levando em consideração que foi observada uma diminuição na dispersão dos dados da DO *versus* DP pelo algoritmo desenvolvido comparado com a dispersão dos dados da DO *versus* a DP pelo algoritmo IWPC (Figura 9), foi testada a estabilidade da terapia com anticoagulação calculando a “diferença na dose semanal” em uma análise prospectiva. Pacientes em dose estável foram acompanhados por um ano (n=318) e divididos em dois grupos de acordo com o valor médio de TTR (<0,73 ou ≥0,73) ou com a presença de todos os valores de RNI dentro da faixa terapêutica.

Interessantemente, a Tabela 4 nos mostra que a “diferença na dose semanal” entre a DO e a DP pelo algoritmo desenvolvido neste estudo foi menor que a “diferença na dose semanal” entre a DO e a DP pelo algoritmo *IWPC*, especialmente em pacientes com $TTR \geq 0,73$ e em pacientes com a presença de todos os valores de RNI dentro da faixa terapêutica ($P < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4- “Diferença na dose semanal” entre a DO e a DP em uma análise prospectiva com pacientes em dose estável acompanhados por 1 ano (n=318)

	Divisão de acordo com a média de <i>TTR</i> (n=318)		Divisão de acordo com a presença de todos os valores de RNI dentro da faixa terapêutica	
	Grupo de pacientes com <i>TTR</i> < 0,73	Grupo de pacientes com <i>TTR</i> $\geq$ 0,73	NÃO (n= 278)	SIM (n= 40)
DO	29,7 $\pm$ 1,1	27,2 $\pm$ 0,9	28,6 $\pm$ 0,8	27,0 $\pm$ 2,1
DO – DP pelo algoritmo desenvolvido	2,1 $\pm$ 1,0	-0,6 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,7	-2,2 $\pm$ 1,5
DO – DP pelo algoritmo <i>IWPC</i>	-2,0 $\pm$ 1,1	-4,4 $\pm$ 0,8	-2,8 $\pm$ 0,7	-5,7 $\pm$ 1,8
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

“Diferença na dose semanal” foi calculada subtraindo DP de DO.

TTR: tempo dentro da faixa terapêutica; DO: dose observada; DP: dose predita.

P valores calculados comparando as variações entre a DO e a DP.

Além disso, a Figura 14 mostra a correlação entre a DP pelo algoritmo *IWPC* e a DP pelo algoritmo desenvolvido nos pacientes sem dose estável (Painel A: RNI > 3,2 e Painel B: RNI < 1,8). Porém, os seus dados foram incluídos nos painéis quando os seus valores de RNI estavam fora da faixa terapêutica que foi emparelhada com a dose atual. As distribuições dos pacientes foram da seguinte forma: 368 pacientes com dose estável; 85 pacientes com RNI > 3,2; 88 pacientes com RNI < 1,8 e 291 pacientes com valores de RNI fora da faixa terapêutica nos últimos dois valores de RNI, ou um valor >

3,2 e outro $< 1,8$. A média da DP da varfarina pelo algoritmo desenvolvido foi menor que a DO nos pacientes com $\text{RNI} > 3,2$ ($27,2 \pm 0,8$ e $30,6 \pm 1,2$ mg/semana; $p = 0,01$, respectivamente); enquanto que a média de DP da varfarina não foi diferente que a DO nos pacientes com $\text{RNI} < 1,8$ ($27,9 \pm 0,8$ e $26,7 \pm 0,8$ mg/semana; $p = 0,10$, respectivamente).

Figura 14- Correlação entre a DP pelo algoritmo (www.warfarindosing.org) e a DP pelo algoritmo desenvolvido em pacientes com $\text{RNI} > 3,2$ e $\text{RNI} < 1,8$. ($\text{RNI} > 3,2$: Painel A, $n=85$, $r^2=0,89$, $P<0,001$) ($\text{RNI} < 1,8$: Painel B, $n=88$, $r^2=0,90$, $P<0,001$).

5.7 Frequências do polimorfismo no gene *VKORC1* e dos fenótipos metabólicos preditos da *CYP2C9* na população geral

Os resultados referentes à população geral estão descritos em outro trabalho publicado pelo nosso grupo. Mostrando que o polimorfismo no gene *VKORC1* foi diferentemente distribuído de acordo com a etnia autodeclarada: Brancos (50,5%), Pardos (46,0%), Negros (39,3%), Tupiniquins (40,1%), e Guaranis (37,3%) ($P<0,001$).

A frequência dos fenótipos metabólitos preditos da *CYP2C9* também foram significativamente diferentes de acordo com a etnia. A frequência do *IM+PM* foi maior nos Brancos (28,3%) do que nos Pardos (22,7%), Negros (20,5%), Tupiniquins (12,9%), e Guaranis (5,3%). Para as amostras com ancestralidade determinada, as que trazem o genótipo GG para o *VKORC1* obtinham uma maior ancestralidade Africana e uma menor ancestralidade Europeia ($0,14 \pm 0,02$ e $0,62 \pm 0,02$) que as amostras que trazem o genótipo AA para o *VKORC1* ($0,05 \pm 0,01$ e $0,73 \pm 0,03$) (P valor = 0,009 e 0,03, respectivamente). As amostras classificadas pelo *IM+PM* tiveram uma menor ancestralidade Africana ($0,08 \pm 0,01$) que os *EM* ($0,12 \pm 0,01$) (P= 0,02). Desta forma, os polimorfismos na *CYP2C9* e na *VKORC1* foram diferentemente distribuídos de acordo com a etnia autodeclarada ou de acordo com a ancestralidade genética na população geral brasileira e nos ameríndios ⁵⁷.

O estudo do desenvolvimento do algoritmo está publicado e disponível no Apêndice C ⁵⁸. Além disso, foi publicado outro artigo científico que avaliou o impacto do *TTR* na terapia com varfarina nos mesmos pacientes incluídos neste trabalho e concluiu que a idade influencia no valor de *TTR*, este trabalho está disponível no Apêndice D ⁵⁹.

Posteriormente, será testada a aplicabilidade do algoritmo em um novo grupo de pacientes do Instituto do Coração (InCor), o protocolo deste estudo está publicado e disponível no Apêndice E ⁶⁰.

6 DISCUSSÃO

Estudos sugerem que algoritmos que incluem a informação genética podem: estimar de forma mais efetiva a dose de varfarina e, conseqüentemente, o paciente poderá atingir o alvo terapêutico de forma mais rápida e segura em relação à prática clínica já utilizada^{46, 61, 62}. No entanto, o cenário real do custo benefício da aplicação do algoritmo farmacogenético não é totalmente entendido e estudos clínicos estão sendo desenvolvidos. O FDA recomenda a tabela de dose de acordo com o resultado dos genótipos, mas ainda não aprovou nenhum algoritmo que converta os dados clínicos e genotípicos em uma recomendação de dose⁶³.

No presente estudo, foi possível desenvolver e replicar o algoritmo desenvolvido em duas coortes de pacientes. Este algoritmo é composto por nove variáveis estimadoras de dose, alcançando um coeficiente de determinação (R^2) de 40,0% e foi replicado em uma segunda coorte.

6.1 Média da dose de varfarina e eventos adversos de acordo com os polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*

Os genótipos da *CYP2C9* e *VKORC1* foram associados com a dose estável de varfarina e com a frequência de sangramentos menores, o que condiz com a literatura^{26, 39, 64, 65}.

Foi identificada uma média de dose menor em pacientes que possuem o fenótipo AA quando comparados com o genótipo GG para o polimorfismo *VKORC1* ($21,5 \pm 1,2$ mg/semana; $32,2 \pm 0,6$ mg/semana, respectivamente). Isso também se repete em outros

trabalhos publicados^{64, 66, 67}. Santos e seus colaboradores demonstraram que o genótipo GG necessita de uma maior dose ($37,1 \pm 1,7$) que o genótipo AA ($25,4 \pm 3,6$)²⁶.

Em relação aos eventos adversos, neste estudo não foram identificados casos de sangramentos maiores. Em uma meta análise realizada com estudos randomizados controlados, incluindo 2639 participantes e com o objetivo de comparar os algoritmos farmacogenéticos e clínicos. Eles identificaram que as variáveis incluídas no algoritmo farmacogenético reduziram significativamente o risco de sangramentos maiores⁶⁸.

Outro estudo mostrou que em indivíduos que possuem os alelos variantes *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3* há um aumento do risco de complicações por sangramentos⁶⁹. No entanto, muitos estudos prévios demonstram que o impacto dos fatores genéticos no risco excessivo de anticoagulação ou sangramentos, nos pacientes tratados com varfarina ocorre principalmente durante o período de início do tratamento^{70, 71}. A literatura mostra que a informação genética na decisão da terapia com varfarina diminui as hospitalizações por hemorragia e por tromboembolismo^{37, 72, 73}.

6.2 Derivação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina

Os achados sugerem que o algoritmo desenvolvido é capaz de prever a dose ideal de varfarina de acordo com as características clínicas, medicações e dados genéticos de cada paciente. Alguns estudos, os quais analisaram algoritmos farmacogenéticos, incluindo o algoritmo *IWPC*, mostraram valores de R^2 similares ao algoritmo desenvolvido neste estudo (de 39 a 47%)^{46, 74}. Porém, altos valores de R^2 foram observados em outros estudos (de 53% a 63%)^{34, 36, 43, 44, 61-64, 67, 75}. Baixos valores de R^2 estão usualmente associados a populações etnicamente miscigenadas e altos valores estão associados a populações homogêneas de ascendência europeia^{43, 76, 77}.

A complexidade da miscigenação da população brasileira, pode ser sugerida como uma oportunidade de explorar a farmacogenômica dos indivíduos com ancestralidade heterogênea sob condições ambientais e socioeconômicas similares ⁷⁸. Em relação à ancestralidade, estudos anteriores mostraram que a maioria dos brasileiros estão divididos entre as ancestralidades europeia e africana, e um número considerável de indivíduos também possui ancestralidade ameríndia; com a proporção da ancestralidade associada a cor/raça auto declarada e região geográfica ^{57, 78-81}.

Ainda, no Brasil os estudos farmacogenéticos obtêm resultados diferentes quando comparados com os obtidos nos Estados Unidos, podendo ser explicado pela decorrente heterogeneidade genômica da população brasileira. Dessa forma, os algoritmos construídos especificamente para outras populações não necessariamente podem ser aplicados na população brasileira ^{55, 82}.

Além disso, os indivíduos de ascendência africana têm diferentes padrões de herança de variação genética quando comparados com os europeus ⁸³. Por este motivo, a literatura atualmente está estudando mais a fundo os algoritmos farmacogenéticos para que possam melhorar a dose predita de uma maneira mais ampla e efetiva para todos.

Um estudo realizado no Sul do Brasil com pacientes de ancestralidade Europeia reportou um dos maiores valores de R^2 da literatura (63,3%). Os autores utilizaram diversas variáveis incluindo os genótipos da *CYP4F2*, haplótipo do *VKORC1* e medicações, as quais juntas possuem um potencial de adicionar 10,6% no modelo ⁴³. Outro estudo brasileiro explicou 51% da dose de varfarina em pacientes com dose estável e ancestralidade miscigenada ⁴⁴. Porém, testando esses algoritmos na população específica, o resultado não foi superior ao algoritmo desenvolvido neste trabalho. Isto ocorreu provavelmente, por utilizar uma população diferente e por ter outras variáveis incluídas no algoritmo.

Além disso, estudos mostraram que os genótipos do gene *CYP2C9* associados aos genótipos do gene *VKORC1* contribuíram aproximadamente com 45 e 30% da variabilidade interindividual da dose de varfarina em populações africanas e europeias, respectivamente ^{30, 70, 77, 84, 85}. Alguns estudos incluíram nos seus algoritmos outros polimorfismos nos genes *CYP4F2*, *APOE*, *CALU*, *GGCX*, *FVII* e observaram um pequeno aumento no desempenho do algoritmo ^{43, 64, 67, 77}. Um estudo realizado em chineses mostrou que em um modelo de regressão o polimorfismo no gene *CYP4F2* contribuiu de forma menos efetiva na dose estável diária que os polimorfismos nos genes *VKORC1* e *CYP2C9* (4,8%, 31,7% e 20,6%, respectivamente).

Recomenda-se que os testes de *VKORC1*, *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 sejam considerados para todos que irão fazer uso de varfarina, incluindo os pediátricos, nas primeiras 2 semanas de tratamento ou após um evento hemorrágico. Acrescenta-se que os testes para *CYP2C9* *5, *6, *8, *11 e *CYP4F2* não são recomendados ⁸⁶.

Em relação ao uso de medicação concomitante, neste estudo, a dose de varfarina foi significativamente associada à amiodarona, ao uso de drogas indutores enzimáticos e, por conta disso, estas variáveis foram incluídas neste algoritmo. Enquanto que a dose de varfarina não foi associada ao uso de estatina e de inibidores da bomba de prótons, não incluindo então, estes dados no algoritmo.

Alguns estudos adicionaram outras drogas como variáveis estimadoras, assim como estatina, amlodipina, beta-bloqueadores e diuréticos, atingindo uma melhora de 5% na predição de dose de varfarina, porém o mesmo não foi necessário no algoritmo desenvolvido neste trabalho ^{43, 44, 62}.

6.3 Replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina

Neste presente estudo, além da derivação do algoritmo, foi possível realizar uma avaliação de replicação, utilizando as amostras de pacientes coletadas em tempos diferentes. Além disso, o algoritmo desenvolvido neste estudo foi testado em um grande número de pacientes com dose estável, em uma avaliação de seguimento. Esta análise indicou a estabilidade do modelo e sugeriu que o algoritmo desenvolvido é aplicável para os pacientes brasileiros de ancestralidade miscigenada e mais acurado quando comparado a outros algoritmos de dose para varfarina disponíveis na literatura.

Dois achados deste estudo sugeriram que o algoritmo desenvolvido se mostrou melhor acurado que os algoritmos *IWPC*, Botton's e Perini para os indivíduos da população brasileira. Primeiro, na amostra de replicação, a correlação entre a DP e a DO do algoritmo desenvolvido neste estudo foi mais alta (0,61) que a correlação entre a DP e a DO por outros algoritmos (*IWPC*-0,51, Botton's- 0,32 e Perini- 0,49). Na Figura 12 pode-se observar uma menor dispersão da correlação dos dados quando utilizado o algoritmo desenvolvido. Segundo, em uma análise prospectiva foi avaliada a estabilidade da anticoagulação observando uma diferença na dose semanal entre a DO e a DP pelo algoritmo *IWPC* ($P < 0,001$). Esses achados sugerem que o algoritmo desenvolvido para uma população específica pode ser mais efetivo.

6.4 Avaliação do *TTR*

O *TTR* foi utilizado no estudo clínico para avaliar a efetividade da terapia com varfarina, particularmente quando o tratamento tem sido comparado com outras estratégias, como por exemplo, algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose, algoritmos clínicos, prática clínica, tabela farmacogenética, entre outros⁸⁷. Também, há

evidência de que um melhor controle da anticoagulação (alto *TTR*) pode proteger os pacientes de eventos adversos severos ou fatais^{87, 88}.

A média do *TTR* ao longo de um período de um ano de acompanhamento realizado como um delimitador, é utilizado como um marcador da estabilidade da anticoagulação (*TTR* de 0,73 para pacientes em dose estável provenientes da primeira coorte) e foi hábil para identificar diferenças significativas entre a “diferença na dose semanal” para a DP e a DO entre os algoritmos (o algoritmo desenvolvido versus o *IWPC*). Isto é, o mais próximo que o indivíduo estiver, no começo do seguimento, da DO pelo algoritmo desenvolvido (em oposição da dose calculada pelo *IWPC*), mais estável estará o regime da anticoagulação durante o próximo ano. Desta forma, sugere-se então, que o algoritmo desenvolvido não está somente associado com uma melhor precisão da determinação da dose, como também, com uma maior estabilidade da terapia com anticoagulante comparado com o algoritmo *IWPC* na população Brasileira.

Ademais, o algoritmo desenvolvido mostrou uma menor variação na diferença na dose semanal quando comparado com o *IWPC*, sendo que o algoritmo desenvolvido neste trabalho possui uma tendência em aumentar a dose semanal e o *IWPC* possui a tendência em diminuir a dose. Este fenômeno também é possível ser observado em outros estudos⁸⁹.

6.5 Utilização de algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose

Por fim, a varfarina tem sido utilizada pelo mundo todo por mais de 50 anos e é efetiva na prevenção e no tratamento de AVC e tromboembolismo venoso. No entanto, os desafios na personalização da dosagem já são sabidos. A otimização do tratamento com a varfarina utilizando ferramentas como, por exemplo, algoritmos estimadores de

dose, têm sido testados como uma estratégia clínica para melhorar a efetividade do tratamento. Porém, estudos randomizados e pesquisas controladas observaram diferentes achados nos seus resultados, devido ao fato de que estes estudos utilizaram amostra de populações e desenho de estudos diferentes⁵²⁻⁵⁴. Consequentemente, ainda não se sabe se a incorporação das informações farmacogenéticas são realmente úteis na decisão de dose prescrita para varfarina. Uma razão frequentemente citada para isto é a escassez de estudos randomizados e controlados que mostrem a superioridade da escolha da dose pela informação genética como estratégia de rotina.

6.6 Limitações

Primeiro, a casuística somente incluiu indivíduos adultos que tinham alvo de RNI entre 2 e 3 para modelar o algoritmo desenvolvido. Portanto, os resultados obtidos não podem ser extrapolados para pacientes que tenham outros valores de alvo de RNI e nem para crianças. Segundo, este estudo foi desenvolvido com pacientes provenientes de um único centro, porém, foi hábil quanto à seleção de pacientes em diferentes tempos para as duas coortes. Terceiro, não foram avaliados a dieta (especialmente ingestão de alimentos ricos em vitamina K), a prática de exercícios físicos pelo paciente e a aderência ao medicamento apresentada pelo paciente. Porém, o impacto dessas variáveis é provavelmente pequeno^{46, 89-91}.

7 CONCLUSÃO

Este estudo desenvolveu um algoritmo estimador de dose de varfarina em duas coortes de pacientes independentes. Os dados sugerem que o algoritmo desenvolvido neste estudo é mais acurado que o algoritmo *IWPC* quando a aplicação é focada em pacientes da população brasileira. Além disso, o trabalho sugere que algoritmos estimadores de dose de varfarina derivados e/ou calibrados em uma população específica podem ser mais acurados, quando comparado com algoritmos de uso geral disponíveis atualmente. Estudos randomizados com o algoritmo farmacogenético desenvolvido nesta população específica necessitam ser realizados com o objetivo de avaliar os impactos do uso do algoritmo sobre a qualidade do tratamento com varfarina e sobre dados farmacoeconômicos.

8 ANEXO A- ESCORE *HAS-BLED*

<i>H</i>	Hipertensão (>160 mmHg)	1
<i>A</i>	Disfunção renal ou hepática (1 ponto cada)	1-2
<i>S</i>	Acidente vascular cerebral	1
<i>B</i>	Sangramento	1
<i>L</i>	RNI's não estáveis	1
<i>E</i>	Idosos (>65 anos)	1
<i>D</i>	Medicamentos ou álcool (1 ponto cada)	1-2

9 REFERÊNCIAS

1. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schunemann HJ. Executive summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis. 9th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012. 141(2 Suppl):7S-47S.
2. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008. 133(6 Suppl):160S-198S.
3. Beyth RJ, Milligan PE, Gage BF. Risk factors for bleeding in patients taking coumarins. *Curr Hematol Rep*. 2002. 1(1):41-49.
4. Fang MC, Go AS, Chang Y, Hylek EM, Henault LE, Jensvold NG, Singer DE. Death and disability from warfarin-associated intracranial and extracranial hemorrhages. *Am J Med*. 2007. 120(8):700-705.
5. Penning-van Beest FJ, van Meegen E, Rosendaal FR, Stricker BH. Characteristics of anticoagulant therapy and comorbidity related to overanticoagulation. *Thromb Haemost*. 2001. 86(2):569-574.
6. Shehab N, Sperling LS, Kegler SR, Budnitz DS. National estimates of emergency department visits for hemorrhage-related adverse events from clopidogrel plus aspirin and from warfarin. *Arch Intern Med*. 2010. 170(21):1926-1933.

7. Johnson JA, Cavallari LH, Beitelshes AL, Lewis JP, Shuldiner AR, Roden DM. Pharmacogenomics: application to the management of cardiovascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2011. 90(4):519-531.
8. Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghorri J, Hunt S, Eriksson N, Wallerman O, Melhus H, Wadelius C, Bentley D, Deloukas P. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 2005. 5(4):262-270.
9. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012. 141(2 Suppl):e44S-88S.
10. Scanavacca MI, Darrieux F. Factors in Deciding between Novel and Traditional Oral Anticoagulants to Prevent Embolism in Atrial Fibrillation Patients. *Arq Bras Cardiol* 2016, 106 (1-13).
11. Santos PCL. Atenção farmacêutica - contexto atual, exames laboratoriais e acompanhamento farmacoterapêutico. Atheneu: Rio de Janeiro. 2016 472p .
12. Goodman LS, Gilman A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006.
13. Teles JS, Fukuda EY, Feder D. Warfarin: pharmacological profile and drug interactions with antidepressants. *Einstein (Sao Paulo)*.2012. 10(1):110-115.
14. Bleeding during antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. *Arch Intern Med.* 1996. 156(4):409-416.
15. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ, Svensson PJ, Veenstra DL, Crowther M, Guyatt GH. Evidence-based management of

- anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012. 141(2 Suppl):e152S-184S.
16. Rang PH, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Churchill Linvingstone, 2004.
 17. Gallagher AM, Setakis E, Plumb JM, Clemens A, van Staa TP. Risks of stroke and mortality associated with suboptimal anticoagulation in atrial fibrillation patients. *Thromb Haemost*. 2011. 106(5):968-977.
 18. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briet E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*. 1993. 69(3):236-239.
 19. Becker RC, Bassand JP, Budaj A, Wojdyla DM, James SK, Cornel JH, French J, Held C, Horrow J, Husted S, Lopez-Sendon J, Lassila R, Mahaffey KW, Storey RF, Harrington RA, Wallentin L. Bleeding complications with the P2Y₁₂ receptor antagonists clopidogrel and ticagrelor in the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Eur Heart J*. 2011. 32(23):2933-2944.
 20. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, Gaston KL, Waddell CD, Chirico MJ, Johnson JA. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther*. 2006. 79(4):291-302.
 21. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, Deykin D. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 2001. 119(1 Suppl):8S-21S.

22. Gage BF, Eby CS. Pharmacogenetics and anticoagulant therapy. *J Thromb Thrombolysis*. 2003. 16(1-2):73-78.
23. Saito R, Takeda K, Yamamoto K, Nakagawa A, Aoki H, Fujibayashi K, Wakasa M, Motoyama A, Iwadare M, Ishida R, Fujioka N, Tsuchiya T, Akao H, Kawai Y, Kitayama M, Kajinami K. Nutri-pharmacogenomics of warfarin anticoagulation therapy: VKORC1 genotype-dependent influence of dietary vitamin K intake. *J Thromb Thrombolysis*. 2014. 38(1):105-114.
24. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, Kim RB, Roden DM, Stein CM. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med*. 2008. 358(10):999-1008.
25. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*. 2002. 287(13):1690-1698.
26. Santos PC, Dinardo CL, Schettert IT, Soares RA, Kawabata-Yoshihara L, Bensenor IM, Krieger JE, Lotufo PA, Pereira AC. *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013. 69: 789
27. Billeci AM, Agnelli G, Caso V. Stroke pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother*. 2009. 10(18):2947-2957.
28. Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed *CYP2C9*, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in

- patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics*. 1998. 8(5):365-373.
29. Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008. 64(10):953-960.
 30. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005. 352(22):2285-2293.
 31. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, Wu JY, Chen YT. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet*. 2005. 14(13):1745-1751.
 32. Soares RA, Santos PC, Machado-Coelho GL, do Nascimento RM, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms are differently distributed in the Brazilian population according to self-declared ethnicity or genetic ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012. 16(8):957-963.
 33. Ferder NS, Eby CS, Deych E, Harris JK, Ridker PM, Milligan PE, Goldhaber SZ, King CR, Giri T, McLeod HL, Glynn RJ, Gage BF. Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during the initial weeks of therapy. *J Thromb Haemost*. 2010. 8(1):95-100.
 34. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005. 106(7):2329-2333.

35. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, Kahn SF, May HT, Samuelson KM, Muhlestein JB, Carlquist JF. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*. 2007. 116(22):2563-2570.
36. Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R, Jr., Linder MW. Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin Chem*. 2007. 53(7):1199-1205.
37. Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, DJ OK, Xia F, Verbrugge RR, Gage BF, Teagarden JR. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *J Am Coll Cardiol*. 2010. 55(25):2804-2812.
38. Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics*. 1995. 5(6):389-392.
39. Ozer N, Cam N, Tangurek B, Ozer S, Uyarel H, Oz D, Guney MR, Ciloglu F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population. *Heart Vessels*. 2010. 25(2):155-162.
40. Coumadin: warfarin sodium [on-line]. Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA. Disponível em: www.accessdata.fda.gov
41. Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *J Am Coll Cardiol*. 2011. 57(5):612-618.

42. Zineh I, Pacanowski M, Woodcock J. Pharmacogenetics and coumarin dosing--recalibrating expectations. *N Engl J Med*. 369(24):2273-2275.
43. Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br J Clin Pharmacol*. 2013. 72(3):442-450.
44. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, Dias-Neto E, Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008. 84(6):722-728.
45. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Valle B, Bandres F, Calvo E, Lucia A, Gomez Gallego F. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS One*. 2010. 5(6):e11210.
46. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009. 360(8):753-764.
47. Burmester JK, Berg RL, Yale SH, Rottschait CM, Glurich IE, Schmelzer JR, Caldwell MD. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med*. 2011. 13(6):509-518.
48. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther*. 2008. 83(3):460-470.
49. McMillin GA, Melis R, Wilson A, Strong MB, Wanner NA, Vinik RG, Peters CL, Pendleton RC. Gene-based warfarin dosing compared with standard of care

practices in an orthopedic surgery population: a prospective, parallel cohort study. *Ther Drug Monit.* 2010. 32(3):338-345.

50. You JH. Pharmacoeconomic evaluation of warfarin pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother.* 2011. 12(3):435-441.
51. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Woller SC, Samuelson KM, Mansfield JW, Robinson M, Barton S, Brunisholz K, Mower CP, Huntinghouse JA, Rollo JS, Siler D, Bair TL, Knight S, Muhlestein JB, Carlquist JF. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II). *Circulation.* 2012. 125(16):1997-2005.
52. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, Kesteven P, Christersson C, Wahlstrom B, Stafberg C, Zhang JE, Leathart JB, Kohnke H, Maitland-van der Zee AH, Williamson PR, Daly AK, Avery P, Kamali F, Wadelius M. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med.* 2013. 369(24):2294-2303.
53. Verhoef TI, Ragia G, de Boer A, Barallon R, Kolovou G, Kolovou V, Konstantinides S, Le Cessie S, Maltezos E, van der Meer FJ, Redekop WK, Remkes M, Rosendaal FR, van Schie RM, Tavridou A, Tziakas D, Wadelius M, Manolopoulos VG, Maitland-van der Zee AH. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N Engl J Med.* 2013. 369(24):2304-2312.
54. Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, Rosenberg YD, Eby CS, Madigan RA, McBane RB, Abdel-Rahman SZ, Stevens SM, Yale S, Mohler ER, 3rd, Fang MC, Shah V, Horenstein RB, Limdi NA, Muldowney JA, 3rd, Gujral J, Delafontaine P, Desnick RJ, Ortel TL, Billett HH,

- Pendleton RC, Geller NL, Halperin JL, Goldhaber SZ, Caldwell MD, Califf RM, Ellenberg JH. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med*. 2013. 369(24):2283-2293.
55. Santos RV, da Silva GO, Gibbon S. Pharmacogenomics, human genetic diversity and the incorporation and rejection of color/race in Brazil. *Biosocieties*. 2015. 10(1):48-69.
 56. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*. 2010.138(5):1093-1100.
 57. Soares RA, Santos PC, Machado-Coelho GL, Nascimento RM, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. CYP2C9 and VKORC1 Polymorphisms Are Differently Distributed in the Brazilian Population According to Self-Declared Ethnicity or Genetic Ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012. 16(8):957-963.
 58. Santos PC, Marcatto LR, Duarte NE, Soares RA, Strunz CM, Scanavacca M, Krieger JE, Pereira AC. Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration. *Pharmacogenomics*.2015. 1-12.
 59. Marcatto LR, Sacilotto L, Darrieux FC, Hachul DT, Scanavacca MI, Krieger JE, Pereira AC, Lima Santos PC. *Oncotarget*. 2016. 7(34):54194-54199.
 60. Marcatto LR, Sacilotto L, Bueno CT, Facin M, Strunz CM, Darrieux FC, Scanavacca MI, Krieger JE, Pereira AC, Santos PC. Evaluation of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm in patients with low time in therapeutic range - study protocol for a randomized controlled trial. *BMC Cardiovasc Disord*.16(1):224.

61. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghorri MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*. 2009. 113(4):784-792.
62. Cho HJ, On YK, Bang OY, Kim JW, Huh W, Ko JW, Kim JS, Lee SY. Development and comparison of a warfarin-dosing algorithm for Korean patients with atrial fibrillation. *Clin Ther*. 2011. 33(10):1371-1380.
63. Wu AH, Wang P, Smith A, Haller C, Drake K, Linder M, Valdes R, Jr. Dosing algorithm for warfarin using CYP2C9 and VKORC1 genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. *Pharmacogenomics*. 2008. 9(2):169-178.
64. Krishna Kumar D, Shewade DG, Lorient MA, Beaune P, Balachander J, Sai Chandran BV, Adithan C. Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and GGCX genetic variants on warfarin maintenance dose and explicating a new pharmacogenetic algorithm in South Indian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014. 70(1):47-56.
65. Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z. 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*. 2007. 63(12):1135-1141.
66. Oner Ozgon G, Langaee TY, Feng H, Buyru N, Ulutin T, Hatemi AC, Siva A, Saip S, Johnson JA. VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated with warfarin dose requirements in Turkish patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008. 64(9):889-894.
67. Mazzaccara C, Conti V, Liguori R, Simeon V, Toriello M, Severini A, Perricone C, Meccariello A, Meccariello P, Vitale DF, Filippelli A, Sacchetti L. Warfarin

anticoagulant therapy: a Southern Italy pharmacogenetics-based dosing model. *PLoS One*. 2013. 8(8):e71505.

68. Wang ZQ, Zhang R, Zhang PP, Liu XH, Sun J, Wang J, Feng XF, Lu QF, Li YG. Pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm decreases time to stable anticoagulation and the risk of major hemorrhage: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015. 65(4):364-370.
69. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*. 1999. 353(9154):717-719.
70. Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR, Goldstein JA, Rieder MJ, Flockhart DA, Arnett DK, Acton RT, Liu N. VKORC1 polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. *Pharmacogenomics*. 2008. 9(10):1445-1458.
71. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Stein CM, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2009. 113(17):3925-3930.
72. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 2011. 364(12):1144-1153.
73. Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Bonfanti C, Mannucci PM. Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2014. 12(9):1480-1487.

74. Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost.* 2004. 91(1):87-94.
75. Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J Thromb Thrombolysis.* 2010. 30(2):220-225.
76. Botton MR, Hutz MH, Suarez-Kurtz G. Influence of the CYP2C9*3 allele on the pharmacological interaction between warfarin and simvastatin. *Pharmacogenomics.* 2012. 13(14):1557-1559.
77. Ramos AS, Seip RL, Rivera-Miranda G, Felici-Giovanini ME, Garcia-Berdecia R, Alejandro-Cowan Y, Kocherla M, Cruz I, Feliu JF, Cadilla CL, Renta JY, Gorowski K, Vergara C, Ruano G, Duconge J. Development of a pharmacogenetic-guided warfarin dosing algorithm for Puerto Rican patients. *Pharmacogenomics.* 2014. 13(16):1937-1950.
78. Suarez-Kurtz G, Paula DP, Struchiner CJ. Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case. *Pharmacogenomics.* 2014. 15(2):209-219.
79. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003.100(1):177-182.
80. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG, Seidman CE, Krieger JE, Pereira AC. Brazilian urban population genetic

- structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet.* 2012. 20(1):111-116.
81. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011. 6(2):e17063.
 82. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics in the brazilian population. *Front Pharmacol.* 2010. 1:118.
 83. Price ET. Warfarin pharmacogenomics and African ancestry. *Blood.* 2015. 126(4):434-436.
 84. Cavallari LH, Langaee TY, Momary KM, Shapiro NL, Nutescu EA, Coty WA, Viana MA, Patel SR, Johnson JA. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2010. 87(4):459-464.
 85. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghorji J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet.* 2007. 121(1):23-34.
 86. Shaw K, Amstutz U, Kim RB, Lesko LJ, Turgeon J, Michaud V, Hwang S, Ito S, Ross C, Carleton BC. Clinical Practice Recommendations on Genetic Testing of CYP2C9 and VKORC1 Variants in Warfarin Therapy. *Ther Drug Monit.* 2015. 37(4):428-436.
 87. Rose AJ, Ozonoff A, Berlowitz DR, Henault LE, Hylek EM. Warfarin dose management affects INR control. *J Thromb Haemost.* 2009. 7(1):94-101.

88. Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J, Flaker G, Commerford P, Franzosi MG, Healey JS, Yusuf S. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as measured by time in therapeutic range. *Circulation*. 2008.118(20):2029-2037.
89. Wei M, Ye F, Xie D, Zhu Y, Zhu J, Tao Y, Yu F. A new algorithm to predict warfarin dose from polymorphisms of CYP4F2 , CYP2C9 and VKORC1 and clinical variables: derivation in Han Chinese patients with non valvular atrial fibrillation. *Thromb Haemost*. 2012. 107(6):1083-1091.
90. Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med*. 2004.116(10):651-656.
91. You JH, Wong RS, Waye MM, Mu Y, Lim CK, Choi KC, Cheng G. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients. *J Thromb Thrombolysis*. 2011. 31(1):113-118.

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Avaliação farmacogenética para os genes *CYP2C9* e *VKORC1* em pacientes usuários de varfarina e em indivíduos da população geral brasileira

PESQUISADOR: Dr. Alexandre da Costa Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente, Médico Pesquisador – InCor – HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 97329

UNIDADE DO HCFMUSP: InCor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☐

O risco é baixo e decorrente da punção venosa (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Registro das explicações do pesquisador ao paciente ou seu representante legal sobre a pesquisa, consignando:

Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa. Este projeto tem como objetivos principais para os pacientes usuários da varfarina associar o efeito das alterações no DNA (polimorfismos) com a dose do medicamento necessária para a anticoagulação, ou a existência de episódios de efeitos adversos. Neste projeto vamos estudar o seu material genético (o DNA). O objetivo do estudo é saber por que algumas pessoas respondem bem ao medicamento varfarina, enquanto outras pessoas não respondem ou até apresentam efeitos adversos, como por exemplo, sangramentos. Para isto precisaremos de uma amostra de sangue (amostra de mesma quantidade do exame para avaliar a anticoagulação, o RNI, que normalmente é feito de rotina para as pessoas que usam a varfarina), assim como seu consentimento para que dados de seu prontuário médico sejam consultados. Os desconfortos mais comuns que podem ocorrer com sua participação neste estudo são os mesmos de uma coleta de sangue no braço, por exemplo, leve dor no local da punção e eventualmente leve dor ou hematoma local. Este sangue será encaminhado ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração onde será armazenado somente para a pesquisa. Sua participação é totalmente voluntária. Ainda, você poderá solicitar o seu desligamento deste projeto a qualquer momento bastando para tal entrar em contato com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (telefone (11) 30695527). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Alexandre da Costa Pereira, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Instituto do Coração, Bloco 2, andar 10, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, telefone (11) 3069 5527. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br. Poderá também solicitar a destruição das amostras de DNA que estarão armazenadas no mesmo laboratório.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Não há benefício direto para o participante. Porém, nossos resultados poderão encontrar relação entre as alterações estudadas no material genético (DNA) e condições de terapêutica efetiva e de efeito adverso para pacientes tratados com varfarina.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE B- QUESTIONÁRIO

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

"Avaliação farmacogenética para os genes CYP2C9 e VKORC1 em pacientes usuários de varfarina"

__/__/20__

Dados Gerais:

DNA paciente: _____ Doença hepática: _____ Uso de outros anticoagulantes: _____

Nome completo: _____ RG-InCor: _____

Iniciais: _____ Sexo: F__ M__ Idade: _____

Altura: _____ Peso: _____ IMC (kg/m²): _____ Etnia: _____

Fuma: _____ Álcool: _____ quantidade: _____

Indicação: _____

TVP: _____ AVC: _____ TEP: _____ FLUTTER/TROMBO: _____ Outras: _____

Outras comorbidades (Sim ou Não):

Diabetes: ____ Hipertensão: ____ ICC: ____ Hiperlipedemia: ____ Isquemia cardíaca: ____ Ins. renal: ____

Início da anticoagulação (ano): _____

Dose indicada inicialmente: _____ 1º valor de RNI: _____ Data: _____

Dose de manutenção (semana): _____ RNI (atual): _____

Últimos dois valores de RNI: _____, data _____; _____, data _____.

Efeitos adversos: _____ RNI >4: _____

RNI 7-10dias: _____ Dose média - 7-10dias: _____

RNI 30-60dias: _____ Dose média - 30-60dias: _____

RNI 180-360dias: _____ Dose média - 180-360dias: _____

Medicação:

Amiodarona / Cordarone*: _____

Artorvastatina/Lipitor*/Caduet*; Fluvastatina/Lescor*; Lovastatina/Mevacor*/Altoprev*/Advicor* _____

Pravastatina/parvachol*; Rosuvastatina/Crestor*; Sinvastatina/Zocor*/Vytorina*: _____

Qualquer azole (Omeprazol; Pantoprazol): _____

Sulfametoxazol / Septra / Bactrim / Cotrim / Sulfatrim: _____

Ibuprofeno (Advil, Motrin, Alivium) ou Naproxeno (Naprosyn, Flanax): _____

Diclofenaco (Voltaren) ou outro Antiinflamatório: _____

Amitriptilina ou Anti-depressivos: _____

Observações: _____

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pharmacogenomics

Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration

Background: The main aims of the present study were to develop a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and to validate it in a highly admixed population. **Materials & methods:** We included two patient cohorts treated with warfarin (first cohort, $n = 832$; and second cohort, $n = 133$). **Results:** Our algorithm achieved a determination coefficient of 40% including the variables age, gender, weight, height, self-declared race, amiodarone use, enzyme inducers use, *VKORC1* genotypes and predicted phenotypes according to *CYP2C9* polymorphisms. **Conclusion:** Data suggest that our developed algorithm is more accurate than the IWPC algorithm when the application is focused on patients from the Brazilian population. Population-specific derivation and/or calibration of warfarin dosing algorithms may lead to improved performance compared with general use dosing algorithms currently available.

Original submitted 26 November 2014; Revision submitted 9 April 2015

Keywords: algorithm • *CYP2C9* • *VKORC1* • warfarin

Warfarin is the most widely prescribed oral anticoagulant agent worldwide [1]. This drug is used in antithrombotic therapy and prevention of thrombosis [2]. Stable maintenance warfarin dose is difficult to establish due to a narrow therapeutic window and great inter-individual variability on its pharmacodynamics and pharmacokinetics responses. As such, warfarin therapy must be monitored by the international normalized ratio (INR). Indeed, several studies showed that the higher the INR the higher is the increase in the risk of bleeding, whereas low INRs are associated with increased risk of thromboembolism or stroke [3,4].

Furthermore, studies showed the association between warfarin dose and polymorphisms in the gene encoding the cytochrome P-450 2C9 isoenzyme (*CYP2C9*) and the vitamin K epoxide reductase complex 1 (*VKORC1*). *CYP2C9* isoenzyme is responsible for metabolizing the active S-warfarin enantiomer and *VKORC1* recycles reduced vitamin K during the activation process of

the clotting factors [5–7]. In 2007, the US FDA added information to the warfarin product label, highlighting the importance of the pharmacogenetic effect on the product, especially regarding *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 and *VKORC1* 1639G > A polymorphisms. In 2011, the FDA reviewed the information of pharmacogenetic effect on maintenance warfarin doses based on *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes for the clinicians [8–10].

Since then, pharmacogenetic algorithms for predicting warfarin dose have been proposed, taking advantage of clinical, concurrent medication and genetic data. Nonetheless, there is still dispute whether warfarin therapy guided by genotype information improves this pharmacotherapy and what is the cost-benefit of this approach [11]. Pirmohamed *et al.* followed up, for 12 weeks, patients who were recruited in the UK and Sweden. They identified that the mean percentage of time in the therapeutic range (TTR) was higher in the genotype-guided group (67.4%) compared with the control

Paulo Caleb Junior Lima Santos^{1,2}, Leiliane Rodrigues Marcatto¹, Nubia Esteban Duarte¹, Renata Alonso Gadi Soares¹, Celia Maria Cassaro Strunz², Mauricio Scanavacca³, Jose Eduardo Krieger¹ & Alexandre Costa Pereira¹

¹Laboratory of Genetics & Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Cerqueira Cesar, São Paulo, CEP 05403-000, Brazil

²Clinical Laboratory, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

³Clinical Cardiology Division, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

*Author for correspondence:

Tel.: +55 112 661 5929

Fax: +55 112 661 5022

pcaleb@usp.br

Future
Medicine part of

group (60.3%, $p < 0.001$) [12]. Verhoef *et al.* studied patients taking acenocoumarol or phenprocoumon recruited in The Netherlands and Greece. They identified that genotype-guided dosing did not improve the TTR during the first 12 weeks after the initiation of therapy (61.6 and 60.2%; $p = 0.52$). However, they identified different TTR during the first 4 weeks after the initiation of treatment in the pharmacogenetic and control groups (52.8 and 47.5%; $p = 0.02$) [13]. Kimmel *et al.*, studying patients from 18 clinical centers in the USA, concluded that genotype-guided dosing of warfarin did not improve anticoagulation control during the first 4 weeks of therapy [14]. Likely, the different findings observed in these three published randomized, controlled trials [12–14] might be, at least partially, related to different sampled populations and study designs, including slightly different dosing-algorithms.

In this scenario, the main aims of this study were to develop a population-specific pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and to compare the performance of the newly derived dosing-scheme with internationally available algorithms.

Materials & methods

Patients & study design

This is a cross-sectional study that included two patient cohorts treated with warfarin for at least 12 months, prior to enrollment, at the Heart Institute (Incor), University of São Paulo, São Paulo, Brazil. They were enrolled in two different time periods: from September, 2011 to March, 2012 (first cohort, $n = 832$) and from January 2014 to February 2014 (second cohort, $n = 133$). The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (Register Number 0804/10), and written informed consent was obtained from all participants prior to entering the study. Patients with chronic liver failure, using other anticoagulant drugs, receiving chemotherapy and who referred alcoholism were excluded. Patients were separated in self-declared 'racial/color' subgroups according to the criteria used by the Brazilian Census, as White, Intermediate (meaning Brown, *Pardo* in Portuguese) or Black [15,16]. Data regarding current drug use were obtained through a standardized interview with a pharmacist and checked on electronic medical records.

Derivation, replication & performance testing phases of the pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm

Figure 1 shows the analytical design used.

Warfarin doses were determined by the physicians who were unaware of the *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes. HAS-BLED score was used to estimate the risk of bleeding on anticoagulation therapy. Patients who

did not have increased risk were prescribed 5 mg/day of warfarin (35 mg/week), while patients who had increased risk were prescribed 2.5 mg/day of warfarin (17.5 mg/week) [17].

Algorithm derivation was made using data from patients from the first cohort that, at enrollment, presented on warfarin stable maintenance dose ($n = 368$), in other words, achievement of the therapeutic target defined as three consecutive values of INR between 2.0 and 3.0 (including the current test). Patients with INR values from 1.8 to <2.0 or from >3.0 to 3.2 did not change their warfarin doses; however, INR was repeated in 7 days.

Dose-prediction model was derived in the following way (derivation sample, $n = 368$). First, we adjusted multiple linear regression models to select the variables to be included in our algorithm. Initial selection was based on the already existing IWPC warfarin-dosing algorithm. The model was selected according to the coefficient of determination R^2 and the significance of each covariate added to the model. Next, we performed a series of permutations to define the best and more stable weighting scheme for each covariate. This was performed by dividing the sample into two random subgroups (276 and 92) and, in each subgroup, adjusting the preselected multiple linear regression model. The effects of the covariates of interest on warfarin maintenance dose, as well as, the goodness of fit of the model by R^2 were saved for the two generated models (i.e., using 276 and 92 individuals). In order to verify the stability of the effects and adjustment, this process was repeated 10,000-times (details in the 'Results' section). Finally, the average effect of each covariate on the 10,000 permutations was obtained and these values are proposed for the final algorithm.

A sample of 133 patients in current stable dose was enrolled in a different time period to be used as a replication sample of the derived algorithm (second cohort).

In a performance testing phase, a sample was then formed from patients who were not on stable dose at the enrollment period of the first cohort ($n = 464$). Furthermore, a follow-up evaluation was made with patients on stable dose from the first cohort ($n = 368$). They were followed up for 1 year ($n = 318$), individual TTRs were calculated and patients were divided into two groups according to the median TTR (<0.73 or ≥ 0.73) or with the presence of all INR values within the therapeutic target during the one-year follow-up period. This analysis was used as a proxy of anticoagulation stability.

Measures & outcomes

Oral anticoagulant therapy was assessed by the prothrombin time (PT) using an automated coagulometric method. INR calculation was obtained by the

Figure 1. Analytical design: derivation, replication and performance testing phases.

ratio PT of the patient/normal PT controls, elevated to the international sensitivity index. Venous blood samples were collected in tubes containing sodium citrate 3.8%. Follow-up of INR for dose adjustment was decided according to physician discretion based on guideline recommendations [2,18].

Blood samples were collected to assess current INR and DNA analysis. Besides current INR, past INR values were checked in electronic medical records from the 12 months preceding enrollment. TTR was calculated by the Rosendaal method [19], which uses linear interpolation to assign an INR value to each day between successive observed INR values.

Major bleeding was defined mainly as fatal bleeding, intrapericardial bleeding with cardiac tamponade, intracranial bleeding, severe hypotension or hypovolemic shock due to bleeding and requiring either vasopressors or surgical intervention, a decline in hemoglobin of 5.0 g/dL or more after adjusting for red blood cell transfusions. Minor bleeding was classified as any bleeding event requiring medical intervention but not meeting the criteria for major bleeding [20].

Genotyping & predicted metabolic phenotypes according to CYP2C9 & VKORC1 polymorphisms

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the standard salting-out method. Genotyping of *CYP2C9**2 (c.430C > T, rs1799853), *CYP2C9**3 (c.1075A > C, rs1057910) and *VKORC1* 3673 (g.1639G > A, rs9923231) polymorphisms was detected by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme digestion [21,22]. As quality control, 6% of the samples were reanalyzed and gave identical results.

Patients were divided into distinct predicted phenotypes: extensive metabolizer (EM: wild-type genotypes for the *CYP2C9* polymorphisms – *1/*1), inter-

mediate metabolizer (IM: heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms – *1/*2 or *1/*3) and poor metabolizer (PM: mutant homozygous or compound heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms – *2/*2 or *3/*3 or *2/*3) [23].

Statistical analysis

Categorical variables are presented as percentages, while continuous variables are presented as mean $\pm$ standard deviation or standard error of the mean. Chi-square test was performed for the comparative analysis of the categorical variables (such as adverse events, and Hardy-Weinberg equilibrium calculation) according to the polymorphisms status. The Student's *t*-test was used for comparing differences between predicted doses (PD), observed doses (OD) and 'difference in weekly dose' between OD and PD; and for comparing warfarin dose, and TTR according to predicted metabolic phenotypes due to *CYP2C9* polymorphisms. One-way ANOVA (analysis of variance) test was used for the analysis of the warfarin dose and TTR according to *VKORC1* genotypes. Tukey's *post hoc* test was performed to identify the different groups. Mean warfarin dose was adjusted for age, gender, BMI and race. Multiple logistic regression analysis was used to identify variables associated with minor or major bleedings. Pearson correlation was performed to evaluate the correlation between observed and predicted doses. In the multiple linear regression models the following variables were included: age (years), gender, weight (kg), height (cm), self-declared race, amiodarone use, enzyme inducers use, *VKORC1* genotypes and predicted phenotypes due to *CYP2C9* polymorphisms (EM, IM or PM). The level of significance set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were car-

Figure 1. Analytical design: derivation, replication and performance testing phases.

ratio PT of the patient/normal PT controls, elevated to the international sensitivity index. Venous blood samples were collected in tubes containing sodium citrate 3.8%. Follow-up of INR for dose adjustment was decided according to physician discretion based on guideline recommendations [2,18].

Blood samples were collected to assess current INR and DNA analysis. Besides current INR, past INR values were checked in electronic medical records from the 12 months preceding enrollment. TTR was calculated by the Rosendaal method [19], which uses linear interpolation to assign an INR value to each day between successive observed INR values.

Major bleeding was defined mainly as fatal bleeding, intrapericardial bleeding with cardiac tamponade, intracranial bleeding, severe hypotension or hypovolemic shock due to bleeding and requiring either vasopressors or surgical intervention, a decline in hemoglobin of 5.0 g/dL or more after adjusting for red blood cell transfusions. Minor bleeding was classified as any bleeding event requiring medical intervention but not meeting the criteria for major bleeding [20].

Genotyping & predicted metabolic phenotypes according to CYP2C9 & VKORC1 polymorphisms
Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the standard salting-out method. Genotyping of *CYP2C9**2 (c.430C > T, rs1799853), *CYP2C9**3 (c.1075A > C, rs1057910) and *VKORC1* 3673 (g.1639G > A, rs9923231) polymorphisms was detected by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme digestion [21,22]. As quality control, 6% of the samples were reanalyzed and gave identical results.

Patients were divided into distinct predicted phenotypes: extensive metabolizer (EM: wild-type genotypes for the *CYP2C9* polymorphisms – *1/*1), inter-

mediate metabolizer (IM: heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms – *1/*2 or *1/*3) and poor metabolizer (PM: mutant homozygous or compound heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms – *2/*2 or *3/*3 or *2/*3) [23].

Statistical analysis

Categorical variables are presented as percentages, while continuous variables are presented as mean ± standard deviation or standard error of the mean. Chi-square test was performed for the comparative analysis of the categorical variables (such as adverse events, and Hardy-Weinberg equilibrium calculation) according to the polymorphisms status. The Student's *t*-test was used for comparing differences between predicted doses (PD), observed doses (OD) and 'difference in weekly dose' between OD and PD; and for comparing warfarin dose, and TTR according to predicted metabolic phenotypes due to *CYP2C9* polymorphisms. One-way ANOVA (analysis of variance) test was used for the analysis of the warfarin dose and TTR according to *VKORC1* genotypes. Tukey's *post hoc* test was performed to identify the different groups. Mean warfarin dose was adjusted for age, gender, BMI and race. Multiple logistic regression analysis was used to identify variables associated with minor or major bleedings. Pearson correlation was performed to evaluate the correlation between observed and predicted doses. In the multiple linear regression models the following variables were included: age (years), gender, weight (kg), height (cm), self-declared race, amiodarone use, enzyme inducers use, *VKORC1* genotypes and predicted phenotypes due to *CYP2C9* polymorphisms (EM, IM or PM). The level of significance set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were car-

Mean warfarin dose, adverse events & frequencies of patients within therapeutic range according to VKORC1 & CYP2C9 polymorphisms

In the overall group from the first cohort ($n = 832$), mean warfarin dose was significantly lower in patients carrying IM+PM predicted phenotypes (25.8 ± 0.8 mg/week) compared with EM patients (29.7 ± 0.5 mg/week) ($p < 0.001$). For the *VKORC1* polymorphism, patients carrying GG genotype had higher mean warfarin dose (32.3 ± 0.6 mg/week) compared with patients carrying AA genotype (21.5 ± 1.2 mg/week) ($p < 0.001$). Figure 2 shows that warfarin dose was also significantly different according to polymorphisms in the patients from the derivation sample ($n = 368$), even after adjustment for covariates.

TTR values and frequency of patients on stable dose were not different between EM patients ($61.4 \pm 24.5\%$ and 44.8% , respectively) and IM + PM patients ($62.0 \pm 23.7\%$ and 44.0% , respectively) ($p = 0.78$ and $p = 0.84$, respectively). Also for *VKORC1* genotypes, the TTR and the frequency of patients within the therapeutic target were not different.

Regarding adverse events, frequency of a previous history of major bleedings was not different according to genotypes. However, frequency of a previous history of minor bleedings was more frequent in IM + PM patients (55.7%) compared with EM patients

(45.0% ; $p = 0.007$). A tendency was observed for a lower frequency of minor bleedings in patients carrying GG genotype for the *VKORC1* polymorphism (GG: 43.5% , GA: 52.2% , AA: 50.0% ; $p = 0.06$). In a multivariate logistic regression analysis, the IM + PM was a variable associated with minor bleedings (OR: 1.49 , 95% CI: 1.07 – 2.08 ; $p = 0.02$), in a model including the covariates age, gender, race, BMI, amiodarone use, enzyme inducers use and *VKORC1* genotypes.

Derivation of the pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm

Table 2 shows the final model for the developed algorithm. The model was developed with 368 patients in stable dose (derivation sample). The construction of the model achieved a multiple R^2 of 40% including nine variables.

The inclusion of the variables such as statin use, proton-pump inhibitors use, indication for treatment and smoking did not improve the algorithm performance, as well as, they did not present significant p values on multiple or simple linear regression models. Carbamazepine and phenytoin were the CYP enzyme inducers considered in this analysis. Supplementary Figure 1 (see online at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.15.48) shows histograms of distributions of the R^2 for the two

Figure 2. Warfarin dose in the patients on stable maintenance dose (derivation sample) according to *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms from first cohort ($n = 368$). *CYP2C9**2 c.C445T (rs1799853), *CYP2C9**3 c.A1100C (rs1057910) and *VKORC1* c.G1639A (rs9923231) polymorphisms. Data are expressed as mean $\pm$ standard error. Values for the *VKORC1* genotypes (GG, $n = 174$; GA, $n = 151$; AA, $n = 43$) with different superscript symbols (f,g) are significantly different (Tukey's *post hoc* test). These data were adjusted for age, gender, BMI and race. Stable maintenance dose means three consecutive values of INR between 1.8 and 3.2 (including the current test). EM: Extensive metabolizer ($n = 269$); IM: Intermediate metabolizer; PM: Poor metabolizer (IM + PM, $n = 99$).

Table 2. Variables of the warfarin dosing algorithm in a multiple linear regression model.

Variable	β coefficient (standard deviation)	95% CI
Age	-0.16 (0.03)	-0.16, -0.15
Gender	-1.65 (0.80)	-1.66, -1.63
Weight	0.15 (0.02)	0.15, 0.15
Height	0.08 (0.06)	0.07, 0.08
'Race/color'	0.36 (0.61)	0.34, 0.37
Amiodarone use	-7.34 (0.87)	-7.35, -7.31
Enzyme inducers use	22.42 (6.41)	22.29, 22.55
VKORC1 genotypes	-6.68 (0.53)	-6.69, -6.67
CYP2C9 polymorphisms	-2.52 (0.75)	-2.53, -2.50

Characteristics of the variables: age (years); gender (1, if male, otherwise 0); weight (kg); height (cm); 'race/color' (self-declared as White, Brown or Black - 1, 2 and 3, respectively); amiodarone use (1, if patient took amiodarone, otherwise 0); enzyme inducers use (1, if patient took inducers drugs, otherwise 0); VKORC1 genotypes (GG, GA or AA - 0, 1 and 2, respectively); and predicted metabolic phenotypes according to CYP2C9 polymorphisms (extensive metabolizer, intermediate metabolizer, poor metabolizer: - 0, 1 and 2, respectively).
CYP2C9*2, c.430C > T (rs1799853), CYP2C9*3, c.1075A > C (rs1057910), and VKORC1 g.1639G > A (rs9923231) polymorphisms.

groups (3/4 and 1/4 due to overall 368 from derivation sample). Also, Supplementary Figure 2 shows a histogram of distributions of the R^2 variation.

In the derivation sample ($n = 368$), Figure 3 shows a moderate correlation between PD and OD ($r^2 = 0.51$, $p < 0.001$). In addition, Supplementary Figure 3 shows a strong correlation between PD by our algorithm and PD by IWPC algorithm ($r^2 = 0.87$, $p < 0.001$).

Replication phase of the pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm

Figure 4 shows the correlation between PD and OD in the replication sample ($n = 133$). Interestingly, when comparing the correlation between the predicted dose by the derived algorithm and the empirical dose and the correlation between the predicted doses derived from the IWPC, Botton's and Perini's algorithms and the empirical dose, we can observe a lower dispersion of the data in the first correlation. We also found higher correlation coefficient (r^2) (0.61) compared with IWPC, Botton's and Perini's algorithms (0.51, 0.32 and 0.49, respectively).

Performance testing phase of the algorithm

Figure 5 shows the 'difference in weekly dose' between OD and PD by our and IWPC algorithms in the patients from first cohort. The 'difference in weekly dose' between OD and PD was lower using our algorithm compared with the IWPC algorithm (0.5 ± 0.6 mg/week vs -3.5 ± 0.6 ; $p < 0.001$, respectively), in the derivation group. We also observed sig-

nificant findings in the 'difference in weekly dose' for patients with $INR > 3.2$ or $INR < 1.8$ (Figure 5).

Since we observed a lower dispersion of the data of OD versus PD by the derived algorithm compared with dispersion of the data of OD versus PD by the IWPC algorithm (Figure 4), we tested the stability of anticoagulation therapy by calculating the 'difference in weekly dose' in a prospective analysis. Patients in stable dose were followed up for 1 year ($n = 318$) and divided into two groups according: median TTR value (< 0.73 or ≥ 0.73) or with the presence of all INR values within the therapeutic target. Interestingly, Table 3 shows that the 'difference in weekly dose' between OD and PD by our algorithm was lower than the 'difference in weekly dose' between OD and PD by IWPC algorithm, especially in the patients with $TTR \geq 0.73$ and in the patients with the presence of all INR values within the therapeutic target ($p < 0.001$) (Table 3).

Supplementary Figure 4 shows the correlation between PD by the IWPC algorithm and PD by our algorithm in the patients without a stable dose upon ascertainment (Panel A: $INR > 3.2$ and Panel B: $INR < 1.8$). Patients without stable dose were those who did not have three consecutive values of INR between 1.8 and 3.2. However, their data only were included on the panels when their INR values were out of therapeutic range in the current test, which is paired with the current dose. The overall distribution of patients was 368 patients with stable dose, 85 patients with $INR > 3.2$, 88 patients with $INR < 1.8$ and 291 patients with INR values out of therapeutic range in the past two tests, or one INR value > 3.2 and another < 1.8 . Mean warfarin PD by our algorithm was lower than OD in the patients with $INR > 3.2$ (27.2 ± 0.8 and 30.6 ± 1.2 mg/week; $p = 0.01$, respectively); while mean warfarin PD was not different than OD in the patients with $INR < 1.8$ (27.9 ± 0.8 and 26.7 ± 0.8 mg/week; $p = 0.10$, respectively).

Discussion

Some studies suggested that algorithms that include genetic information, may transform the management of warfarin dosing achieving the target INR faster, safer, and in a more cost-effective manner than current practice [24–26]. However, the current cost-benefit of algorithm application in a real-life scenario is not fully understood and clinical trials have been developed to address this issue. Also, FDA released a genotype-related dosing table, but not yet approved any dosing algorithm that will convert genotyping data into a dosing recommendation [27].

In the present study, we were able to develop and validate our algorithm in two patient cohorts. Our algorithm, composed of nine predictor variables, achieved

a coefficient of determination (R^2) of 40.0% and was validated in a second, independent, sample from the same population. These findings suggest that our algorithm is able to adjust an optimal warfarin dose according to clinical, medication and genetic data from each patient. Some studies, including the IWPC algorithm, showed R^2 values similar to ours (from 39 to 47%) [9,24]. But, higher R^2 values were observed by other studies (from 53 to 63%) [22,25–33]. Lower observed R^2 are usually associated with ethnically admixed populations and, on the other hand, higher values in homogeneous populations of European ancestry [30,34,35].

It has been suggested that the complexity of population admixture in Brazil is indeed an opportunity to explore pharmacogenomics in individuals with heterogeneous genetic ancestry under similar environmental and socioeconomic conditions as well as people who are under-represented in clinical drug trials [36]. Regarding ancestry, previous studies showed that most Brazilians share European and African ancestries, and a sizeable number of subjects also have Amerindian ancestry; with the relative ancestry proportion associated with self-declared 'color/race' and geographical regions [15,36–39].

A study with Southern Brazilian patients of European ancestry reported one of the highest R^2 values in the literature (63.3%) [30]. The authors used a large number of variables including *CYP4F2* genotype, *F2* genotype, *VKORC1* haplotype and several concurrent

Figure 3. Correlation between predicted dose by our algorithm and observed dose ($n = 368$, $r^2 = 0.51$, $p < 0.001$) in the derivation sample. Stable maintenance dose means three consecutive values of international normalized ratio between 1.8 and 3.2 (including the current test).

medications, which, taken together, have potential to add 10.6% on the model [30]. Another Brazilian study explained 51% of the warfarin dose in stable patients of mixed ancestry [31]. In our study, besides the derivation of the algorithm, we were able to perform a replication evaluation using a patient sample ascertained in a different time period. Furthermore, our algorithm was also

Figure 4. Correlation between predicted doses and observed dose ($n = 133$) in the validation sample. (A) Predicted dose (PD) by our algorithm ($r^2 = 0.61$, $p < 0.001$), (B) PD by IWPC algorithm ($r^2 = 0.51$, $p < 0.001$), (C) PD by Botton's algorithm ($r^2 = 0.32$, $p < 0.001$), and (D) PD by Perini's algorithm ($r^2 = 0.49$, $p < 0.001$).

Figure 5. 'Difference in weekly dose' between observed doses and predicted doses in the patients from first cohort. Group 1: PD by our algorithm. Group 2: PD by IWPC algorithm. (A) Patients with stable dose. (B) Patients with international normalized ratio >3.2. (C) Patients with international normalized ratio <1.8. 'Difference in weekly dose' was calculated subtracting PD of OD. OD: Observed dose; PD: Predicted dose.

tested using a large number of stable patients in a follow-up evaluation. This analysis indicated the stability of the model and suggested that the derived algorithm applied to a Brazilian patient population of mixed ancestry to be more accurate compared with other warfarin dosing algorithms available in the literature.

Two findings of this present study suggest that our algorithm might be more accurate than the IWPC, Botton's and Perini's algorithms for individuals from the Brazilian population. First, in the replication sample, the correlation between the PD by our algorithm and the OD was higher (0.61) than the correlation between the PD by other tested algorithms and the OD (0.51, 0.32, and 0.49, respectively). Indeed, in Figure 4 one can observe a lower dispersion of the correlation data when using the currently derived algorithm. Second, in a prospective analysis evaluating the anticoagulation stability, we observed that the 'difference in weekly dose' between OD and PD by our algorithm was lower than the 'difference in weekly dose' between OD and PD by the IWPC algorithm ($p < 0.001$). These findings suggest that the develop-

ment of a population-specific algorithm might indeed capture population-specific information.

Regarding concurrent medication in this study, amiodarone and enzyme inducer drugs were significantly associated to warfarin dose and included in our algorithm; while statin use and proton-pump inhibitors use were not associated and, thus, not included. Some studies added other drugs as predictor variables in their algorithms, such as statins, amlodipine, β -blockers and diuretics, achieving an improvement of about 5% [26,30,31].

Regarding genotype variables, we also observed significant findings that are consistent with the literature. *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes were associated with the warfarin stable dose and the frequencies of minor bleedings. The first association is widely known [6,32,40,41]. Some studies showed that *CYP2C9* plus *VKORC1* genotypes contribute approximately with 45 and 30% of warfarin dose interindividual variation in European and African populations, respectively [35,42–45]. Furthermore, some studies incorporated to their algorithms and other polymorphisms

Table 3. 'Difference in weekly dose' between observed dose and predicted dose of a prospective analysis with patients on stable dose followed up for 1 year (n = 318).

	Division according with TTR median (n = 318)		Division according with the presence of all INR values within therapeutic target	
	Patient group with TTR < 0.73	Patient group with TTR ≥ 0.73	No (n = 278)	Yes (n = 40)
OD	29.7 ± 1.1	27.2 ± 0.9	28.6 ± 0.8	27.0 ± 2.1
OD – PD by our algorithm	2.1 ± 1.0	-0.6 ± 0.8	1.2 ± 0.7	-2.2 ± 1.5
OD – PD by IWPC algorithm	-2.0 ± 1.1	-4.4 ± 0.8	-2.8 ± 0.7	-5.7 ± 1.8
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

'Difference in weekly dose' was calculated subtracting PD of OD.
p-values calculated comparing the variations between OD and PDs.
INR: International normalized ratio; OD: Observed dose; PD: Predicted dose; TTR: Time in therapeutic range.

in the *CYP4F2*, *APOE*, *CALU*, *GGCX* and *FVII* genes and observed only a small increment [30,32,33,35].

The TTR, a tool of measuring the achievement of INR target values over time, has been used in the setting of clinical trials to evaluate the effectiveness of warfarin therapy, particularly when warfarin is being compared with some other strategy [46]. Also, there is evidence that better anticoagulation control (i.e., higher TTR) can protect patients from severe or even fatal adverse events [46,47]. Based on the median TTR over a one-year follow-up period as a cut-off, here used as a proxy of anticoagulation stability (TTR of 0.73 for patients in stable dose from the first cohort), we were able to find significant differences between the 'difference in weekly dose' for the PD and OD among algorithms (ours vs IWPC). That is, the closer an individual was, at the beginning of follow-up, to the predicted dose based on our algorithm (as opposed to a dose calculated by the IWPC algorithm), the more stable its anticoagulation regimen stayed during the next year. This suggests our algorithm to be not only associated with a more accurate dose determination, but also to be associated with a higher stability on anticoagulation therapy as compared with the IWPC algorithm in the Brazilian population.

Our study has some limitations. First, we included only adult individuals who had a target INR between 2 and 3 to model our algorithm. Thus, our results cannot be directly transposed to patients who have other target values or to children. Second, our study was a single center study; however, we were able to select – in different time periods – two large cohorts enrolling individuals from different ethnic and socio-economic backgrounds. Third, we were not able to consider dietary factors (especially vitamin K intake) and exercise level, but the impact of this variable is probably small [24,48–50].

Warfarin has been used worldwide for over 50 years and is effective to prevent and treat stroke and

venous thromboembolism. Nonetheless, the challenges to personalize dosage are well-known. Optimization of the warfarin therapy with the use of tools like dosing-algorithms is being tested as a clinical strategy to improve effectiveness. However, the main randomized, controlled trials observed different findings in this regard. Of particular importance, these studies used different sampled populations and designs [12–14]. Consequently, clinical communities are undecided as to the usefulness of incorporating pharmacogenetic information into warfarin prescribing decisions. An often-cited reason is the paucity of randomized, controlled trials showing the superiority of genotype-informed dosing strategies over routine care. Our data suggest that it is important to develop population-specific algorithms to evaluate whether pharmacogenetic-based dosing can capture population-specific information and whether they are or not superior to local standards of care. This information should be taken into consideration in the design and interpretation of current clinical trials.

Conclusion

We were able to develop and validate our algorithm in two independent patient cohorts. Data suggest that our developed algorithm is more accurate than the IWPC algorithm when the application is focused on patients from the Brazilian population. These data suggest that population-specific derivation and/or calibration of warfarin dosing algorithms may lead to improved performance compared with general use currently available dosing algorithms.

Future perspective

Randomized studies using the developed algorithm could evaluate the impact of a population-specific genetic algorithm on the quality of the warfarin therapy and pharmacoeconomic data.

Acknowledgements

The technical assistance of the Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology group, Heart Institute (InCor) and Sociedade Hospital Samaritano – Ministério da Saúde (PROADI-SUS; SIPAR: 25000.180.672/2011-81) is gratefully acknowledged.

Financial & competing interests disclosure

PCJL Santos and NE Duarte are recipients of fellowship from FAPESP, Brazil, Proc.2013/09295-3, Proc.2013/20614-3 and Proc. 2012/00316-5. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Open access

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Executive summary

Background

- Warfarin dose is associated with polymorphisms in the *CYP2C9* and *VKORC1* genes.
- The main aims of the present study were to develop a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and to validate it in a highly admixed population.

Study design

- We included two patient cohorts treated with warfarin.
- The algorithm was created using data from the first cohort of patients with warfarin stable dose.
- We used a second, independent, cohort to validate our algorithm.

Results

- The correlation between the predicted dose by our algorithm and the observed dose was higher than the correlation between the predicted dose by other tested algorithms and the observed dose.
- Data suggest that our developed algorithm is more accurate than the *IWPC* algorithm when the application is focused on patients from the Brazilian population.

Conclusion

- Population-specific derivation and/or calibration of warfarin dosing algorithms may lead to improved performance compared with general use dosing algorithms currently available.

References

- 1 Agno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141(2 Suppl.), e44S–S88 (2012).
- 2 Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schunemann HJ. Executive summary: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141(2 Suppl.), S7–S47 (2012).
- 3 Bleeding during antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation. The stroke prevention in atrial fibrillation investigators. *Arch. Intern. Med.* 156(4), 409–416 (1996).
- 4 Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: stroke prevention in atrial fibrillation III randomised clinical trial. *Lancet* 348(9028), 633–638 (1996).
- 5 Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA *et al.* Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) and vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106(1), 135–140 (2005).
- 6 Santos PC, Dinardo CL, Schettler IT *et al.* *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69(4), 789–797 (2013).
- 7 Sutfin T, Balmer K, Bostrom H, Eriksson S, Hoglund P, Paulsen O. Stereoselective interaction of omeprazole with warfarin in healthy men. *Ther. Drug Monit.* 11(2), 176–184 (1989).
- 8 Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H *et al.* A coding *VKORC1* Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood* 109(6), 2477–2480 (2007).
- 9 Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb. Haemost.* 91(1), 87–94 (2004).
- 10 Coumadin (warfarin sodium) (package insert). Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA. www.accessdata.fda.gov

- 11 Zineh I, Pacanowski M, Woodcock J. Pharmacogenetics and coumarin dosing – recalibrating expectations. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2273–2275 (2014).
- 12 Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N *et al.* A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2294–2303 (2013).
- 13 Verhoef TJ, Ragia G, de Boer A *et al.* A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2304–2312 (2013).
- 14 Kimmel SE, French B, Kasner SE *et al.* A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2283–2293 (2013).
- 15 Soares RA, Santos PC, Machado-Coelho GL *et al.* CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms are differently distributed in the Brazilian population according to self-declared ethnicity or genetic ancestry. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 16(8), 957–963 (2012).
- 16 Santos PC, Soares RA, Santos DB *et al.* CYP2C9 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med. Genet.* 12, 13 (2011).
- 17 Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest* 138(5), 1093–1100 (2010).
- 18 Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 133(6 Suppl.), S160–S198 (2008).
- 19 Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briet E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb. Haemost.* 69(3), 236–239 (1993).
- 20 Becker RC, Bassand JP, Budaj A *et al.* Bleeding complications with the P2Y12 receptor antagonists clopidogrel and ticagrelor in the PLATElet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Eur. Heart J.* 32(23), 2933–2944 (2011).
- 21 Jetter A, Kinzig-Schippers M, Skott A, Lazar A *et al.* Cytochrome P450 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60(3), 165–171 (2004).
- 22 Sconce EA, Khan TI, Wynne HA *et al.* The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7), 2329–2333 (2005).
- 23 Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics* 11(6), 781–791 (2010).
- 24 Klein TE, Altman RB, Eriksson N *et al.* Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N. Engl. J. Med.* 360(8), 753–764 (2009).
- 25 Wadelius M, Chen LY, Lindh JD *et al.* The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 113(4), 784–792 (2009).
- 26 Cho HJ, On YK, Bang OY *et al.* Development and comparison of a warfarin-dosing algorithm for Korean patients with atrial fibrillation. *Clin. Ther.* 33(10), 1371–1380 (2011).
- 27 Wu AH, Wang P, Smith A *et al.* Dosing algorithm for warfarin using CYP2C9 and VKORC1 genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. *Pharmacogenomics* 9(2), 169–178 (2008).
- 28 Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J. Thromb. Thrombolysis* 30(2), 220–225 (2010).
- 29 Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK *et al.* Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin. Chem.* 53(7), 1199–1205 (2007).
- 30 Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 72(3), 442–450 (2011).
- 31 Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E *et al.* Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(6), 722–728 (2008).
- 32 Krishna Kumar D, Shewade DG, Lorient MA *et al.* Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and GGCX genetic variants on warfarin maintenance dose and explicating a new pharmacogenetic algorithm in South Indian population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 70(1), 47–56 (2014).
- 33 Mazzaccara C, Conti V, Liguori R *et al.* Warfarin anticoagulant therapy: a Southern Italy pharmacogenetics-based dosing model. *PLoS ONE* 8(8), e71505 (2008).
- 34 Botton MR, Hutz MH, Suarez-Kurtz G. Influence of the CYP2C9*3 allele on the pharmacological interaction between warfarin and simvastatin. *Pharmacogenomics* 13(14), 1557–1559; author reply 1561–1562 (2013).
- 35 Ramos AS, Seip RL, Rivera-Miranda G *et al.* Development of a pharmacogenetic-guided warfarin dosing algorithm for Puerto Rican patients. *Pharmacogenomics* 13(16), 1937–1950 (2012).
- 36 Suarez-Kurtz G, Paula DP, Struchiner CJ. Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case. *Pharmacogenomics* 15(2), 209–219 (2014).
- 37 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(1), 177–182 (2003).
- 38 Giolo SR, Soler JM, Greenway SC *et al.* Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur. J. Hum. Genet.* 20(1), 111–116 (2012).
- 39 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* 6(2), e17063 (2008).
- 40 Ozer N, Cam N, Tangurek B *et al.* The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population. *Heart Vessels* 25(2), 155–162 (2010).

- 41 Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z. 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 (2007).
- 42 Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR et al. *VKORC1* polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. *Pharmacogenomics* 9(10), 1445–1458 (2008).
- 43 Cavallari LH, Langaee TY, Momary KM et al. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87(4), 459–464 (2010).
- 44 Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF et al. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* 352(22), 2285–2293 (2005).
- 45 Wadelius M, Chen LY, Eriksson N et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum. Genet.* 121(1), 23–34 (2007).
- 46 Rose AJ, Ozonoff A, Berlowitz DR, Henault LE, Hylek EM. Warfarin dose management affects INR control. *J. Thromb. Haemost.* 7(1), 94–101 (2009).
- 47 Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J et al. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as measured by time in therapeutic range. *Circulation* 118(20), 2029–2037 (2008).
- 48 Wei M, Ye F, Xie D et al. A new algorithm to predict warfarin dose from polymorphisms of *CYP4F2*, *CYP2C9* and *VKORC1* and clinical variables: derivation in Han Chinese patients with non valvular atrial fibrillation. *Thromb. Haemost.* 107(6), 1083–1091 (2012).
- 49 Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am. J. Med.* 116(10), 651–656 (2004).
- 50 You JH, Wong RS, Waye MM et al. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients. *J. Thromb. Thrombolysis* 31(1), 113–118 (2011).

Age is associated with time in therapeutic range for warfarin therapy in patients with atrial fibrillation

Leiliane Rodrigues Marcatto^{1,*}, Luciana Sacilotto^{2,*}, Francisco Carlos da Costa Darrieux², Denise Tessariol Hachul², Maurício Ibrahim Scanavacca², Jose Eduardo Krieger¹, Alexandre Costa Pereira¹ and Paulo Caleb Junior Lima Santos¹

¹ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

² Clinical Cardiology Division, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Alexandre Costa Pereira¹, email: alexandre.pereira@incor.usp.br

Paulo Caleb Junior Lima Santos, email: paoaleb@usp.br

Keywords: warfarin, TTR, age, atrial fibrillation, polymorphisms, Gerotarget

Received: May 03, 2016

Accepted: July 19, 2016

Published: July 29, 2016

ABSTRACT

Background: Warfarin is the most prescribed oral anticoagulant used for preventing stroke in patients with atrial fibrillation. Time in the therapeutic range (TTR) has been accepted as the best method to evaluate the quality of warfarin therapy. The main aim of the present study was to evaluate the impact of variables on the time in the therapeutic range for warfarin therapy in patients with atrial fibrillation from a referral cardiovascular hospital.

Methods: This retrospective study included 443 patients were included (190 patients with age < 65 years and 253 patients with age ≥ 65 years) from 2011 to 2014 and TTR was computed according to Rosendaal's method.

Results: Patients with age ≥ 65 years had higher TTR value (67±22%) compared with patients with < 65 years (60±24%) ($p = 0.004$). In a linear regression model, only age ≥ 65 years emerged as a significant predictor of greater TTR values. In multivariate logistic regression model, the variable age ≥ 65 years was associated with higher OR for having a TTR higher than the median value (OR = 2.17, $p < 0.001$).

Conclusion: We suggest that the age influenced TTR through greater drug adherence. Strategies for increasing drug adherence might improve quality of warfarin anticoagulation.

BACKGROUND

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia and it has a high estimated prevalence of 33.5 million people in worldwide [1, 2]. The prevalence of this disease increases with age from < 0.5% between 40 and 50 years, to 5% to 15% at > 80 years of age [3]. AF may be associated with severe consequences, like stroke with neurological deficit and death [4]. Anticoagulation therapy is the most important measure for preventing stroke in the AF setting.

Warfarin is the most commonly used oral anticoagulant for preventing stroke in patients with AF. However, this drug has a narrow therapeutic index and a

large inter-individual variability in dose requirements [5, 6]. Thus, clinicians use the international normalized ratio (INR) for monitoring the warfarin therapy. High values of INR are associated with bleeding while low values of INR are associated with thromboembolism and stroke [7, 8]. INR values are used to calculate the time in the therapeutic range (TTR).

TTR is a measure of quality of anticoagulation therapy and high TTR values mean a good quality of treatment [9, 10]. A study conducted in Europe, included 6,250 patients with AF using warfarin from different countries, showed that TTR levels ranged from 66.0% in Italy to 72.6% in the United Kingdom. In France, Germany, and Italy, less than 50% of the patients had TTR

Table 1: Demographic and clinical characteristics of participating patients according to age over 65 years

Variable	< 65 years n = 190	≥ 65 years n = 253	p value
Sex, female (%)	45.8	41.5	0.37
Self-declared race, White (%)	59.3	73.9	0.001
Body mass index (Kg/m ²)	27.7±5.2	26.9±4.4	0.11
Smoking (%)	7.0	4.8	0.33
Diabetes mellitus (%)	19.1	28.5	0.03
Hypertension (%)	88.9	87.4	0.62
Hyperlipidemia (%)	41.7	45.5	0.43
Heart failure (%)	33.9	29.8	0.36
Warfarin dose (mg/week)	28.8±12.5	26.8±11.5	0.08
Amiodarone use (%)	18.9	15.9	0.40
Time in warfarin therapy (years)	5.0±4.6	6.2±5.0	0.02
CYP2C9 genotypes (IM+PM) (%)	27.1	27.3	0.97
VKORC1 genotypes, GG/GA/AA (%)	47.9/42.6/9.5	43.4/47.8/8.8	0.55

Table 2: Mean TTR according to age over 65 years

	TTR (%)		p value
	< 65 years	≥ 65 years	
Total group (n = 443)	60 ± 24	67 ± 22	0.004
Female (n = 192)	61 ± 23	66 ± 21	0.04
Male (n = 251)	59 ± 25	68 ± 23	0.01

> 70% [11]. Another study, including 377 patients and considering TTR < 60% as a marker of poor quality in the anticoagulation control, showed that 44.3% of the patients had a poor anticoagulation therapy [12].

Age, body mass index, concomitant drugs, patient adherence and genetic factors can influence INR values [13-15]. However, the factors which can significantly influence TTR measures, i.e., warfarin anticoagulation therapy in the long-term are not fully understood [9, 16]. Identification of factors that influence TTR values is important to guide the best clinical approach during the treatment. In this scenario, the main aim of the present study was to evaluate the impact of variables on the TTR for warfarin therapy in patients with AF from a referral cardiovascular hospital.

RESULTS

Table 1 shows demographic and clinical characteristics of the patients according to age over 65 years. Mean age in the younger group was 56±9 years (n = 190) and in the older was 73±6 years (n = 253). We observed higher percentages of self-declared White, diabetes mellitus, and time in warfarin therapy in the group of patients with age ≥65 years compared with group of patients with age < 65 years.

Table 2 shows TTR mean according to age over 65 years. We observed that, in the overall group, patients with age ≥65 years had higher TTR mean than patients with age < 65 years (67±22% and 60±24%, p = 0.004, respectively).

We also observed higher TTR mean in patients with age ≥65 years than patient with age < 65 years in the female group (66±21% and 61±23%, p = 0.04, respectively) and in the male group (68±23% and 59±25%, p = 0.01, respectively). The variable self-declared race was not associated with TTR, even in multivariate models. The TTR mean of the White and non-White groups were not different (64±23% and 62±23%, p = 0.24, respectively).

In a multivariate linear regression model, we analyzed the effect of variables, including age, in years, on TTR values (Table 3). We show that age was also associated with TTR values (p = 0.02). Supplementary table 1 shows a linear regression model with the addition of other variables.

In a multivariate logistic regression model, we analyzed TTR median (≥68.0%) as a dependent variable and the following variables as independent: age ≥65 years, sex (male), self-declared race (White), BMI, smoking, amiodarone use, CYP2C9 predicted metabolic phenotypes (IM+PM) and VKORC1 genotypes (Table 4). The variable age ≥65 years was significantly associated with having a TTR value above the median (OR = 2.17, 95%CI = 1.43-3.28, p < 0.001). Supplementary Table 2 shows a logistic regression model including other independent variables.

DISCUSSION

In the present study, our main finding was that patients with age ≥65 years had higher TTR value than those with age < 65 years. Interestingly, few studies have

Table 3: Multivariate linear regression analysis for TTR

Variable	β standardized coefficient	p value
Age	0.121	0.02
Sex (male)	0.007	0.88
Self-declared race (White)	0.050	0.33
Body mass index	0.029	0.57
Smoking	-0.018	0.72
Amiodarone use	-0.008	0.88
<i>CYP2C9</i> genotypes (IM+PM)	0.006	0.91
<i>VKORC1</i> genotypes	0.006	0.90

Table 4: Multivariate logistic regression analysis for over values of TTR median ($\geq 68.0\%$)

Variables	OR	95% CI	p value
≥ 65 years	2.17	1.43-3.28	<0.001
Sex (male)	1.34	0.89-2.01	0.16
Self-declared race (White)	1.36	0.87-2.12	0.18
Body mass index	1.01	0.97-1.06	0.56
Amiodarone use	0.99	0.59-1.67	0.97
<i>CYP2C9</i> genotypes (IM+PM)	1.22	0.78-1.91	0.39
<i>VKORC1</i> genotypes	0.99	0.72-1.37	0.96

showed this same association. A study including 501 Japanese patients to evaluate factors influencing TTR, such as age, gender, antiplatelet drugs, CHADS₂ score and warfarin dose showed that patients aged ≥ 70 years had TTR of $77 \pm 17\%$ and patients aged < 70 years had TTR of $46 \pm 23\%$ ($p < 0.001$) [16]. Another study, including 6,983 patients from diverse regions of the world, showed that patients with age < 73 years had lower TTR mean levels than patients with age ≥ 73 years (53.6 ± 20.9 vs 56.8 ± 21.5 , respectively, $p < 0.001$) [9]. Furthermore, Skeppholm et al showed that younger patients spent more time out of therapeutic range than older patients [17].

We suggest that TTR can be influenced by age presumably because older people have higher compliance (drug adherence) than younger. Here, we chose the age according to the definition of elderly person by WHO (World Health Organization) [18]. Indeed, it has been showed that age younger than 65 years was a risk factor for non-adherence to warfarin [19-21]. Witt et al showed that mean age was higher in patients adherent than in patients non-adherent (70.9 years vs 63.8 years; $p < 0.001$) [20]. A study examined the medication taking behavior of older adults. They found that age, gender, education level, marital status, living status and health belief affected the medication knowledge and behavior. They also showed that younger patients had a limited knowledge about their disease and this may be a reason for non-adherence [22]. The greatest adherence to treatment by older people might also be influenced for greater severity of illness and successful compliance behavior by caregivers at home [23]. Another study showed that elderly patients were more adherent to medications after hospital discharge, had an increased interaction with the

healthcare system (appointments, number of physician interactions), had higher knowledge about the importance of chronic medication management and had a higher level of experience with managing medications [24]. In the present study, we observed difference in time in warfarin therapy, in years (5.0 ± 4.6 vs 6.2 ± 5.0), according to age group. However, we showed that this small difference did not affect TTR values in a multivariate analysis.

A recent study showed that TTR is an independent predictor of major adverse cardiovascular events in their cohort of AF patients. Moreover, the authors showed that age were positively associated to major adverse cardiovascular events and a good anticoagulation is associated with a reduction of these events [25].

Sex and self-declared race did not influence the TTR in our analysis. Okumura et al also did not find differences in TTR mean according sex [16]. However, Singer et al showed that male patients had higher TTR than female patients (56.4 ± 21.2 vs 53.3 ± 21.3 $p < 0.001$); and Rose et al showed that the group with TTR $> 75\%$ had the lowest proportion of females (37.9%) compared to the group with TTR $< 60\%$ (46.5%, $p < 0.001$) [9, 26]. Bhandari et al reported that African-American patients spent less time in range compared with White-American patients (32.2% vs 42.0%, $p < 0.001$) [27]. Another study showed that African-Americans spent more time in the sub-therapeutic range (INR < 2) [28].

Neither warfarin dose nor *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms influence TTR in the present study. However, Okumura et al. found that warfarin dose affected TTR, patients with a low dose ($< 2.5\text{mg/day}$) had higher TTR compared to patients with higher dose ($\geq 5.0\text{mg/day}$) ($72 \pm 22\%$; $48 \pm 24\%$; $p < 0.001$). They suggested

that age might have affected the dose administered by the physician. Patients aged < 70 years had higher dose (3.5 ± 1.2 mg/day) than patients aged ≥ 70 years (2.7 ± 1.0 mg/day). However, after multivariate analysis, they showed that warfarin dose remained an independent predictor of TTR [16]. Importantly, in our study, the variable age did not affect warfarin dose. Some studies showed that *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms influenced TTR mean during initiation of therapy with warfarin [14, 15, 29]. We did not find this association probably because our patient group were anticoagulated for at least 12 months.

The variables diabetes mellitus, hypertension and heart failure did not influence TTR mean in our study. These variables are components of the CHADS₂ score, which estimates stroke risk in patients with atrial fibrillation. Other variables compose the score, such as age ≥ 75 and a history of stroke or transient ischemic attack symptoms [30, 31]. Okuwura et al. found that CHADS₂ score influenced TTR. Patients with a score ≤ 1 had TTR of $59 \pm 27\%$ and patients with a score ≥ 2 had $68 \pm 23\%$. The authors explained this finding by the fact that the age of the patients with a score ≥ 2 (73 ± 8 years) was significantly higher than those patients with a score ≤ 1 (65 ± 11 years) ($p < 0.001$) [16]. On the contrary, Singer et al found that patients with higher CHADS₂ score (≥ 2) had lower TTR mean levels (score ≤ 2 : TTR = 59.3 ± 19.7 ; score 3-6: TTR = 55.1 ± 21.3 ; $p < 0.01$) [9]. Furthermore, another study showed that CHADS₂ score did not influence TTR [26]. In addition, Singer et al. showed that patients with heart failure had lower TTR mean levels (52.9 ± 21.2 vs 59.0 ± 20.7 $p < 0.001$) [9] and Rose et al. found that heart failure was associated with poor control (TTR < 60% = 26.1% vs TTR > 75% = 20.5% $p < 0.001$) [26].

Our study has some potential limitations. First, we were not able to use SAME TT2R2 score in patients with kidney and liver diseases, because we excluded these patients. Second, we did not apply questionnaires about drug adherence; thus, we were not able to test our hypothesis that the elderly had more drug adherence. Furthermore, we did not assess diet, which might be different according to the age group. Second, the influence of the variables on TTR depends on the characteristics of the patient sample. Our sample included patients with atrial fibrillation treated for at least 12 months with warfarin in a referral hospital. Our findings can be different from those of others because of the specifics of our casuistic.

White et al, analyzing the outcome of 3,587 patients with warfarin therapy from SPORTIF III and IV, indicated that the risks of death, myocardial function and stroke or systemic embolic event were lower in patients with TTR $\geq 60\%$ than in those with TTR < 60% [10]. Here, we highlight the importance of studying variables that may influence TTR levels. We showed that age is associated with TTR. We suggest that age influenced TTR through greater drug adherence. Strategies for increasing

drug adherence might improve the quality of warfarin anticoagulation.

MATERIALS AND METHODS

Patients and study design

This retrospective study included 443 patients with non-valvular AF treated with warfarin for at least 12 months, from 2011 to 2014, from a referral cardiovascular hospital [32]. The Institutional Ethics Committee (Register Number 0804/10) approved the study protocol and written informed consent was obtained from all participants prior to entering the study. The exclusion criteria were patients with chronic liver failure, using other anticoagulant drugs, receiving chemotherapy, and alcoholism. We obtained data regarding current drug use through a standardized interview with a pharmacist and checked electronic medical records.

Measures and outcomes

We used prothrombin time (PT) for evaluating oral anticoagulant therapy and obtained the INR calculation by the ratio PT of the patient/normal PT controls, elevated to the international sensitivity index [6, 33]. We collected blood samples to assess current INR and DNA analysis. Besides, we checked past INR values in electronic medical records from the 12 months preceding enrollment. We calculated TTR of the past 12 months using the Rosendaal method [34], which uses linear interpolation to assign an INR value to each day between successive observed INR values.

Genotyping of *CYP2C9**2 (c.430C > T, rs1799853), *CYP2C9**3 (c.1075A > C, rs1057910), and *VKORC1* 3673 (g.1639G > A, rs9923231) polymorphisms was carried out by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme digestion [35, 36]. As quality control, 6% of the samples were reanalyzed and gave identical results. Patients were divided into distinct predicted phenotypes: extensive metabolizer (EM: wild-type genotypes for the *CYP2C9* polymorphisms - *1/*1), intermediate metabolizer (IM: heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms - *1/*2 or *1/*3) and poor metabolizer (PM: mutant homozygous or compound heterozygous genotypes for the loss-of-function *CYP2C9* polymorphisms - *2/*2 or *3/*3 or *2/*3) [37].

Statistical analysis

We present categorical variables as percentages and continuous variables as mean $\pm$ standard deviation. We divided patients into groups according to age: patients

with < 65 years and patients with ≥65 years [38]. TTR was adjusted for age, sex, BMI (body mass index), and self-declared race. We tested the effect of the age (in years) on TTR values in a multivariate linear regression model including the following independent variables: age, sex, BMI, race, smoking, amiodarone use, *CYP2C9* genotypes (EM, IM or PM), and *VKORC1* genotypes. In addition, we performed a multivariate logistic regression model to evaluate factors associated with values of TTR above median (≥68.0%), including the following variables: age (≥65 years), sex (male), BMI, self-declared race (White), smoking, amiodarone use, *CYP2C9* genotypes (IM+PM), and *VKORC1* genotypes. All statistical analyses were carried out using SPSS software (v. 16.0) and the level of significance set at $p \leq 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

PCJL Santos is recipient from fellowship from FAPESP. The technical assistance of the Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology group and Heart Institute (InCor) is gratefully acknowledged.

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

GRANT SUPPORT

FAPESP, Brazil, Proc.2013/09295-3.

REFERENCES

- Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*. 1995; 155: 469-73.
- Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH Jr, Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014; 129: 837-47.
- Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder I C, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2010; 31: 2369-429.
- Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Kronmal R A, Cushman M, Fried LP, White R, Furberg CD, Rautaharju PM. Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation*. 1997; 96: 2455-61.
- Agno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012; 141: e44S-88S.
- Guyatt GH, Eikelboom JW, Gould MK, Garcia DA, Crowther M, Murad MH, Kahn SR, Falck-Ytter Y, Francis CW, Lansberg MG, Akl EA, Hirsh J. Approach to outcome measurement in the prevention of thrombosis in surgical and medical patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012; 141: e185S-94S.
- Bleeding during antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. *Arch Intern Med*. 1996; 156: p. 409-16.
- Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial. *Lancet*. 1996; 348: p. 633-8.
- Singer DE, Hellkamp AS, Piccini JP, Mahaffey KW, Lokhnygina Y, Pan G, Halperin JL, Becker RC, Breithardt G, Hankey GJ, Hacke W, Nessel CC, Patel MR, et al. Impact of global geographic region on time in therapeutic range on warfarin anticoagulant therapy: data from the ROCKET AF clinical trial. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000067.
- White HD, Gruber M, Feyzi J, Kaatz S, Tse HF, Husted S, Albers GW. Comparison of outcomes among patients randomized to warfarin therapy according to anticoagulant control: results from SPORTIF III and V. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 239-45.
- Cotte FE, Benhaddi H, Duprat-Lomon I, Doble A, Marchant N, Letierce A, Hugnet M. Vitamin K antagonist treatment in patients with atrial fibrillation and time in therapeutic range in four European countries. *Clin Ther*. 2014; 36: 1160-8.
- Caldeira D, Cruz I, Morgado G, Stuart B, Gomes C, Martins C, Joao I, Pereira H. Evaluation of time in therapeutic range in anticoagulated patients: a single-center, retrospective, observational study. *BMC Res Notes*. 2014; 7: 891.
- Santos PC, Soares RA, Strunz CM, Grinberg M, Ferreira JF, Cesar LA, Scanavacca M, Krieger JE, Pereira AC. Simultaneous use of amiodarone influences warfarin maintenance dose but is not associated with adverse events. *J Manag Care Pharm*. 2014; 20: 376-81.
- Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye Anderson A, Kim RB, Roden DM, Stein CM. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med*. 2008; 358: 999-1008.
- Santos PC, Dinardo CL, Schettert IT, Soares RA, Kawabata Yoshihara L, Bensenor IM, Krieger JE, Lotufo PA, Pereira AC. *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013; 69: 789-97.

16. Okumura K, Komatsu T, Yamashita T, Okuyama Y, Harada M, Konta Y, Hatayama T, Horiuchi D, Tsushima E. Time in the therapeutic range during warfarin therapy in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. - A multicenter study of its status and influential factors. *Circ J*. 2011. 75: 2087-94.
17. Skeppholm M, Friberg L. Adherence to warfarin treatment among patients with atrial fibrillation. *Clin Res Cardiol*. 103: 998-1005.
18. WHO (World Health Organization. Definition of an older or elderly person. <http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>. Accessed 25 nov 2015.
19. Pamboukian SV, Nisar I, Patel S, Gu L, McLeod M, Costanzo MR, Heroux A. Factors associated with non-adherence to therapy with warfarin in a population of chronic heart failure patients. *Clin Cardiol*. 2008. 31: p. 30-4.
20. Witt DM, Delate T, Clark NP, Garcia DA, Hylek EM, Ageno W, Dentali F, Crowther MA. Nonadherence with INR monitoring and anticoagulant complications. *Thromb Res*. 2013. 132: e124-30.
21. Waterman AD, Milligan PE, Bayer L, Banet GA, Gatchel SK, Gage BF. Effect of warfarin nonadherence on control of the International Normalized Ratio. *Am J Health Syst Pharm*. 2004. 61: 1258-64.
22. Huang LH. Medication-taking behavior of the elderly. *Kaohsiung J Med Sci*. 1996. 12: 423-33.
23. Monane M, Bohn RL, Gurwitz JH, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. Compliance with antihypertensive therapy among elderly Medicaid enrollees: the roles of age, gender, and race. *Am J Public Health*. 1996. 86: 1805-8.
24. Cohen MJ, Shaykevich S, Cawthon C, Kripalani S, Paasche-Orlow MK, Schnipper JL. Predictors of medication adherence postdischarge: the impact of patient age, insurance status, and prior adherence. *J Hosp Med*. 2012. 7: 470-5.
25. Pastori D, Pignatelli P, Saliola M, Carnevale R, Vicario T, Del Ben M, Cangemi R, Barilla F, Lip GY, Violi F. Inadequate anticoagulation by Vitamin K Antagonists is associated with Major Adverse Cardiovascular Events in patients with atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2015. 201: 513-6.
26. Rose AJ, Ozonoff A, Henault LE, Hylek EM. Warfarin for atrial fibrillation in community-based practice. *J Thromb Haemost*. 2008. 6: 1647-54.
27. Bhandari VK, Wang F, Bindman AB, Schillinger D. Quality of anticoagulation control: do race and language matter? *J Health Care Poor Underserved*. 2008. 19: 41-55.
28. Shen AY, Yao JF, Brar SS, Jorgensen MB, Wang X, Chen W. Racial/Ethnic differences in ischemic stroke rates and the efficacy of warfarin among patients with atrial fibrillation. *Stroke*. 2008. 39: 2736-43.
29. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Stein CM, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2009. 113: 3925-30.
30. Gage BF, Waterman AD, Shannon W, Boechler M, Rich MW, Radford MJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*. 2001. 285: 2864-70.
31. Lip GY, Nieuwlaet R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010. 137: 263-72.
32. Santos PC, Marcatto LR, Duarte NE, Soares RA, Strunz CM, Scanavacca M, Krieger JE, Pereira AC. Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration. *Pharmacogenomics*. 2015. 16: 1-12.
33. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008. 133: 160S-198S.
34. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briet E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*. 1993. 69: 236-9.
35. Jetter A, Kinzig-Schippers M, Skott A, Lazar A, Tomalik-Scharte D, Kirchheiner J, Walchner-Bonjean M, Hering U, Jakob V, Rodamer M, Jabrane W, Kasel D, Brockmoller J, et al. Cytochrome P450 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004. 60: 165-71.
36. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. 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.
37. Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics*. 2010. 11: 781-91.
38. Ahmad S. Lovastatin: Warfarin interaction. *Arch Intern Med*. 1990. 150: p. 2407.

STUDY PROTOCOL

Open Access

Evaluation of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm in patients with low time in therapeutic range – study protocol for a randomized controlled trial

Leiliane Rodrigues Marcatto¹, Luciana Sacilotto², Carolina Tosin Bueno¹, Mirella Fadin², Cella Maria Cassaro Strunz², Francisco Carlos Costa Darrieux², Maurício Ibrahim Scatavacca², Jose Eduardo Krieger¹, Alexandre Costa Pereira^{1*} and Paulo Caleb Junior Lima Santos^{1*}

Abstract

Background: Time in therapeutic range (TTR) is a measurement of quality of warfarin therapy and lower TTR values (<50%) are associated with greater risk of thromboembolic and bleeding events. Recently, we developed a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm specifically calibrated for a Brazilian patient sample. The aims of this study are: to evaluate the impact of a genetic-based algorithm, compared to traditional anticoagulation, in the time to achieve the therapeutic target and in TTR percentage; and to assess the cost-effectiveness of genotype-guided warfarin dosing in a specific cohort of patients with low TTR (<50%) from a tertiary cardiovascular hospital.

Methods/design: This study is a randomized controlled trial in patients ($n = 300$) with atrial fibrillation with TTR < 50%, based on the last three INR values. At the first consultation, patients will be randomized into two groups: TA group (traditional anticoagulation) and PA group (pharmacogenetic anticoagulation). For the first group, the physician will adjust the dose according to current INR value and, for the second group, a pharmacogenetic algorithm will be used. At the second, third, fourth and fifth consultations (with an interval of 7 days each) INR will be measured and, if necessary, the dose will be adjusted based on guidelines. Afterwards, patients who are INR stable will begin measuring their INR in 30 day intervals; if the patient's INR is not stable, the patient will return in 7 days for a new measurement of the INR. Outcomes measures will include the time to achieve the therapeutic target and the percentage of TTR at 4 and 12 weeks. In addition, as a secondary end-point, pharmacoeconomic analysis will be carried out. Ethical approval was granted by the Ethics Committee for Medical Research on Human Beings of the Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School.

Discussion: This randomized study will include patients with low TTR and it will evaluate whether a population-specific genetic algorithm might be more effective than traditional anticoagulation for a selected group of poorly anticoagulated patients.

Trial registration: ClinicalTrials.gov, NCT02592980. Registered on 29 October 2015.

Keywords: Warfarin, Algorithm, Pharmacogenetic, Pharmacoeconomy, Polymorphisms

* Correspondence: alexandre.pereira@incor.usp.br; pcaleb@usp.br

¹Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Av. Dr. Êneas de Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo, SP CEP 05403-000, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Warfarin is a vitamin K antagonist and is the most widely prescribed oral anticoagulant agent worldwide [1]. It is used to prevent morbidity and mortality due to thromboembolism and, for this reason, it is very important to achieve an optimal anticoagulant therapy [2]. Furthermore, warfarin has a narrow therapeutic range and, consequently, patients usually have difficulty achieving and maintaining the therapeutic target [3–5].

Time in therapeutic range (TTR) is a measure of the quality of warfarin therapy, i.e., the percentage of time a patient's INR (international normalized ratio) is within the desired treatment target. Lower TTR values (<50%) are associated with greater risk of thromboembolic and bleeding events; while higher TTR values (>65%) are associated with therapeutic benefits [6, 7]. Some studies identified factors that can affect TTR, such as the use of age, gender, race, and concomitant medications for predicting one's ideal dosage [8–15]. In this scenario, some studies have assessed the impact of pharmacogenetic algorithms to guide the beginning of treatment. Pirmohamed et al. followed-up, for 12 weeks, patients who were recruited in the United Kingdom and Sweden. They used a slightly modified version of the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium algorithm for predicting maintenance doses. They identified that the mean percentage of TTR was higher in the genotype-guided group (67.4%) compared with the control group (60.3%, $p < 0.001$) [16]. Verhoef et al. studied patients taking acenocoumarol or phenprocoumon recruited in the Netherlands and Greece. They used an algorithm developed by EU-PACT group for phenprocoumon and acenocoumarol drugs [17]. They identified that genotype-guided dosing did not improve the TTR during the first 12 weeks after the initiation of therapy (61.6 and 60.2%, $p = 0.52$). However, they identified different TTR during the first 4 weeks after the initiation of treatment comparing pharmacogenetic and control groups (52.8 and 47.5%, $p = 0.02$) [18]. Kimmel et al. studied patients from 18 clinical centers in the United States. They used an algorithm developed by the COAG group [19]. The authors concluded that genotype-guided dosing of warfarin did not improve anticoagulation control during the first 4 weeks of therapy [20].

Recently, we developed a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm specifically tailored for Brazilian individuals, a highly admixed population. It was shown to be more accurate than internationally developed algorithms for individuals from the Brazilian population [21]. Likewise, some other studies have shown that pharmacogenetic algorithms could be more accurate when developed and applied on specific populations [22–24].

Furthermore, studies showed the ability to improve TTR, compared with traditional anticoagulation, using strategies

such as educational intervention, point-of-care testing, and the use of family practice clinics [25–27]. In this context, there is no data in the literature on the specific testing of a pharmacogenetic algorithm in patients with low TTR (<50%). In addition, cost-effectiveness evaluations for this approach are scarce and a positive finding for a pharmacogenetic approach could be very useful in a program of individualized anticoagulation therapy [28–30].

Thus, the aims of this study are: to evaluate the impact of a genetic-based, population-specific, algorithm, compared to traditional anticoagulation, in the time to achieve the therapeutic target and in the percentage of TTR at 4 and 12 weeks; and to assess the cost-effectiveness of genotype-guided warfarin dosing in a specific cohort of patients with low TTR (<50%) from a tertiary cardiovascular hospital.

Methods

Trial design

We will recruit 300 patients with low TTR (<50%) from the Heart Institute- Clinical Hospital-University of São Paulo Medical School (InCor- HCFMUSP).

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Medical Research on Human Beings of the Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School (SDC 4033/14/013). Signed informed consent will be obtained from all participants.

Figure 1 shows the study design. Physicians will select the eligible patients according to the described criteria. At the first consultation, the pharmacist will explain the study and, if the patient accepts to participate, he or she will then sign the term. Patients will be randomized into two groups: TA group (traditional anticoagulation) and PA group (pharmacogenetic anticoagulation). Randomization will be considered protocol starting date. Pharmacists will apply questionnaires and collect blood samples for DNA extraction and measure creatinine, AST and ALT.

Fig. 1 Flowchart of the study design

For the TA group, the physician will adjust the dose according to the current INR value based on current guidelines [31, 32]. For the PA group, the dose will be prescribed based on data from each patient applied in a pharmacogenetic algorithm. In some cases, used algorithm may provide a counter-intuitive dose, i.e., a dose that is not adequate for adjusting the current patient's INR (for example, a higher dose for a patient that already has a high INR). In these cases, the physician will adjust the dose following clinical criteria based on published guidelines and these patients will be kept on PA group [3, 33]. Patients of both groups will receive the medication and receive the pharmaceutical care. On the day after randomization, the pharmacist will inform, by phone, the new weekly dose prescribed for patients of both groups.

At the second (7 days), third (14 days), fourth (21 days), and fifth (28 days) consultations (with an interval of 7 days each), warfarin dosage will be adjusted, if necessary, based on current guidelines [31, 32].

After the fifth consultation, if the patient's INR is within therapeutic target, the next measurement will be made after 30 days. If the patient's INR is not in the therapeutic target, the warfarin dose adjustment will be made and the next INR measurement will be made after 7 days. The main outcomes will be the time to achieve the therapeutic target and the percentage of TTR at 4 and 12 weeks. We will measure the INR of all patients at the 12th week, independently of the value of INR before of this endpoint.

Participants

Only patients with atrial fibrillation, above 18 years, and with TTR <50% based on the last three values of INR will be included in this study. Patients will be excluded if they have reached a stable dose of warfarin, liver dysfunction, alcoholism, use of another anticoagulant, use of chemotherapy, if they changed the dose of amiodarone 1 week before or if they do not meet the inclusion criteria.

Interventions

For the TA group, the physician will adjust the dose according to the current INR value based on current guidelines [31, 32] and using an EP mobile tool for dividing the weekly dose in the days with the availability of tablets [34].

Patients with INR values <1.8 or >3.2 will undergo dose adjustment. For patients with an INR value from 1.8 to <2.0 or from >3.0 to 3.2, warfarin dose will be maintained and INR tests will continue to be made every 7 days. Then, if the patient continues to demonstrate values from 1.8 to <2.0 or from >3.0 to 3.2, warfarin dose will be changed. At each patient consultation, the pharmacist will check the drug adherence counting pills

and adverse events using patient self-reporting information. The average weekly warfarin dose will be changed according to patient's INR value: ≤ 1.5 , increase by 20%; >1.5–<2.0, increase by 5%; >3.0–3.5, decrease by 5%; >3.5–<6.0, hold 1 dose, decrease by 15%; ≥ 6.0 , hold warfarin and consider vitamin K based on guidelines [31, 32].

For the PA group, the dose will be prescribed based on data from each patient applied in a pharmacogenetic algorithm for the first consultation, after will adjust the dose based on guidelines and using the EP mobile [21].

Outcomes

We will use the time to achieve the therapeutic target as primary outcomes measures and the TTR percentages as second outcome measures. We will consider that achieve the therapeutic target is three INR's values within the therapeutic target. We will calculate the TTR in 4 and 12 weeks of follow-up.

Sample size

With a sample size of 150 patients for each arm separately, the study will have a power of 80% to observe a difference of 8% between TTR means of the TA and PA groups, using sigma of 25% and alpha of 0.05.

Randomization

Patients will be randomized into two groups: TA group (traditional anticoagulation) and PA group (pharmacogenetic anticoagulation). The randomization method will be by original generator, which allowed for only one block size. We will use the randomization.com to perform the randomization automatically [35]. We will add two arms with 150 subjects each. Afterward, we will include the list of randomization on the REDCap. This web application choose automatically the arm according to the list of randomization in a way that the information can not be change.

Blinding

In this study, patients will be blinded and will not know their genetic results. The study team will not be blinded.

Laboratorial measures and questionnaires

Oral anticoagulant therapy will be assessed by the prothrombin time (PT) in an automated coagulometric method. Venous blood samples will be collected in tubes containing sodium citrate 3.8%. INR calculation will be obtained by the ratio PT of the patient/normal PT controls, elevated to the international sensitivity index. Besides current INR, past INR values will be checked in electronic medical records. TTR will be calculated by the Rosendaal method [36], which uses linear interpolation to assign an INR value to each day between successive observed INR

values. Peripheral venous blood will be collected into a BD Vacutainer System* without anticoagulant for measurements of serum creatinine, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) by colorimetric and enzymatic assays.

Physicians and pharmacists will also complete a questionnaire for each patient. These will include the following variables: name, age, sex, body mass index, smoking, weekly intake of alcoholic beverages, weekly intake of dark green vegetables, comorbidities, results of last INR values, adverse events, and other drug use. In addition, the physician will evaluate the patients with the CHADS₂VASC₂ and HAS-BLED scores [37–39]. The CHADS₂VASC₂ score estimates stroke risk in patients with atrial fibrillation. The variables are congestive heart failure, hypertension, age ≥ 75, diabetes mellitus, a history of stroke or transient ischemic attack symptoms and vascular disease history [37, 38]. The HAS-BLED score estimates the risk of major bleeding for atrial fibrillation patients on anticoagulation care. "HAS-BLED" is an acronym for Hypertension (uncontrolled, systolic blood pressure >160 mmHg), Abnormal liver (cirrhosis or bilirubin >2x normal or AST/ALT/alkaline phosphatase >3x normal) and renal function (dialysis, transplant, creatinine > 2.6 mg/dL), Stroke history, Bleeding predisposition or Prior Major Bleeding, Labile INRs (unstable/high INRs or TTR < 60%), Elderly (age ≥ 65), Drugs (antiplatelet agents, nonsteroidal anti-inflammatory) or alcohol usage (≥ 8 drinks/week) [39]. Each patient will have an individual record, which remains with the group of pharmacists and physicians. This record will provide information on current warfarin dose (mg/week), daily dose, and INR values. Furthermore, each patient will have a card to register the warfarin daily dose.

The information gathered in the study will be managed using REDCap (Research Electronic Data Capture) tools hosted at the Clinical Hospital from the University of São Paulo Medical School. REDCap is a secure, web-based application designed to support data capture for research studies [40].

Genotyping and predicted metabolic phenotypes

We will collect blood samples using the BD Vacutainer System* containing K₂EDTA (Becton Dickinson, USA). We will use the QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) to extract genomic DNA from peripheral blood leukocytes. Genotyping of CYP2C9*2 (c.430C>T, rs1799853), CYP2C9*3 (c.1075A>C, rs1057910), and VKORC1 3673 (g.1639G>A, rs9923231) polymorphisms will be detected by real time PCR assays using Taqman probes (Applied Biosystems, CA, USA). We will use positive and negative reference samples to test along with the unknown samples in each run. TaqMan probe assay IDs: CYP2C9*2: C_25625805_10, CYP2C9*3: C_27104892_10, VKORC1 3673: C_30403261_20.

Patients will be divided into three distinct predicted phenotypes: extensive metabolizer (EM: wild-type genotypes for the CYP2C9 polymorphisms - *1/*1), intermediate metabolizer (IM: heterozygous genotypes for the loss-of-function CYP2C9 polymorphisms - *1/*2 or *1/*3) and poor metabolizer (PM: polymorphic homozygous or compound heterozygous genotypes for the loss-of-function CYP2C9 polymorphisms - *2/*2 or *3/*3 or *2/*3) [41, 42].

Pharmacogenetic algorithm

The pharmacogenetic algorithm used in this clinical study was developed and validated by our group using two independent patient cohorts. It includes the variables age, sex, weight, height, self-declared race, use of amiodarone, use of enzyme inducers, VKORC1 genotypes, and predicted phenotypes according to CYP2C9 polymorphisms [21].

Pharmacoeconomic analysis

In these analyses we will evaluate the cost-effectiveness of both groups (TA and PA) calculating the costs of the genetic test, INR tests, and physician visits; and the effectiveness of the anticoagulation. We will also estimate costs that will be used to calculate the QALYs (quality-adjusted life year). These results that are used in QALYs are major bleeding, major thromboembolic events, and death. Major bleeding includes any episode of bleeding that requires hospitalization and thromboembolic events include embolic stroke, systemic embolism, ischemic attacks, deep venous thrombosis and pulmonary embolism.

Statistical analysis

Statistical analyses will be carried out using SPSS software (v. 16.0, IBM, New York, NY) and the level of significance set at $p \leq 0.05$. Pharmacoeconomic data will be evaluated using the TreeAge software (TreeAge, Inc., Williamstown, MA). Chi-square tests will be performed for comparative analysis of the categorical variables (such as adverse events, and evaluation of percentage of INR within therapeutic range) according to the polymorphisms or with the two approaches that will be made (TA and PA). Students' *t*-tests or Mann-Whitney tests will be used for comparing TTR means and the time to achieve the therapeutic range according to the two groups. In addition, multivariate linear regression analysis will be used to identify variables associated with the TTR mean and with the time necessary to achieve the therapeutic range. A new randomization will not be performed for substitution of patients with missing data.

Discussion

This randomized study will include patients with low TTR from a cardiovascular tertiary hospital and it was designed to evaluate whether a population-specific genetic algorithm might be more effective than traditional

anticoagulation for a selected group of poorly anticoagulated patients.

Previous clinical trials tested genetic-based algorithms in patients beginning warfarin therapy and found contrasting results [43]. However, no study to date has focused on this specific group of difficult to anticoagulate patients.

Our study has some potential limitations. First, although we will check the adverse effects during the study, we will not be able to analyze them with adequate statistical power. However, since these events may severely affect cost-effectiveness analysis they are contemplated in the study design. Second, we will use an algorithm modeled from a Brazilian cohort of patients and it will be applied in a specific group of patients of a tertiary referral hospital. Thus, applicability of our findings will need of external validity.

Abbreviations

ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; CAPES: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior; CNPQ: Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico; BM: Extensive metabolizer; FAPESP: Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo; IM: Intermediate metabolizer; INR: International normalized ratio; PA: Pharmacogenetic anticoagulation; PM: Poor metabolizer; PT: Prothrombin time; QALYs: Quality-adjusted life year; REDCap: Research electronic data capture; TA: Traditional anticoagulation; TTR: Time in the therapeutic range

Acknowledgements

FAPESP, CAPES and CNPQ for financial support and Farmoquímica S.A for drug donate.

Funding

This project is funded by the FAPESP, Proc. 2013/09295-3 and CNPQ, Proc. 440324/2014-9.

Availability of data and materials

We do not wish to share our data because more clinical variable will be studied.

Authors' contribution

All authors read and approved the final manuscript. LRM, LS, CMCS, FCCD, MIS, JEK, ACP and PCJLS drafted the study protocol and participated in the design of the study. LRM, CTB, LS, MF and PCJLS will select the patients and will collect data from patients. LS, MF and FCCD will adjust the dose. LRM, CTB will carry out the genetic tests, will do the pharmaceutical care, and will follow the patient. PCJLS will do the statistical analysis and will coordinate the study. CMCS will do the laboratorial tests.

Authors' information

LRM is a Master Degree student in a Graduate Studies Program in Health Sciences, University of São Paulo Medical School. LS and CTB is a PhD student in a Graduate Studies Program in Health Sciences, University of São Paulo Medical School. MF is a cardiologist at Heart Institute. FCCD, MIS, JEK, ACP PhD is a cardiologist at Heart Institute. CMCS PhD is a director of the clinical laboratory at Heart Institute. PCJLS PhD is a researcher.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable. All patients signed a consent term.

Ethical approval and consent to participate

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Medical Research on Human Beings of the Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School (SDC 4033/14/013). Signed informed consent will be obtained from all participants.

Registration

Current Controlled Trials number: NCT02592980 named by Evaluation of a Pharmacogenetic-based Warfarin Dosing Algorithm in Patients.

Author details

¹Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Cerqueira Cesar, São Paulo, SP CEP 05403-000, Brazil. ²Arrhythmia Unit, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Cerqueira Cesar, São Paulo, SP CEP 05403-000, Brazil. ³Clinical Laboratory, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Cerqueira Cesar, São Paulo, SP CEP 05403-000, Brazil.

Received: 7 September 2016 Accepted: 8 November 2016

Published online: 17 November 2016

References

1. Stahle S, Kirchheiner J, Lauer A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48:265-84.
2. Lind M, Fahlen M, Molander M, Eliasson B, Odén A. Variability of INR and its relationship with mortality, stroke, bleeding and hospitalizations in patients with atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2012;129:50-5.
3. Agency VR, Galus AS, Whitlocke AS, Covey M, Hyatt BM, Palmer G. Oral anticoagulant therapy. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th edn American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141:445-69.
4. Singer DE, Hullman AS, Rockl JP, Mahaffey WK, Lokhargina V, Pan G, Halperin JL, Becker RC, Brubaker G, Hurler GJ, et al. Impact of global geographic region on time in therapeutic range on warfarin anticoagulant therapy: data from the ROCKET AF clinical trial. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e00087.
5. Caldeira D, Cruz I, Mosquito G, Stuart B, Gomes C, Martins C, Joso I, Pereira H. Evaluation of time in therapeutic range in anticoagulated patients: a single-center, retrospective, observational study. *BMC Res Notes*. 2014;7:691.
6. Ross AJ, Hyatt BM, O'Connor A, Ash AS, Refsum JJ, Berkowitz DR. Risk-adjusted percent time in therapeutic range as a quality indicator for outpatient oral anticoagulation results of the Veterans Affairs Study to Improve Anticoagulation (NAVIA). *Che: Chest*. 2011;140:123-31.
7. White HJ, Gouker M, Foyel J, Korte S, The HF, Husted S, Allesen GN. Comparison of outcomes among patients randomized to warfarin therapy according to anticoagulant control: results from SPORTRF II and V. *Joch Intern Med*. 2007;167:230-45.
8. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ, Svensson PJ, Weistra CL, Covey M, Guyatt GH. Evidence-based management of anticoagulant therapy. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th edn American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141:951-1025.
9. Nasser S, Mulian J, Bolewicz B. Challenges of older patients' knowledge about warfarin therapy. *J Prim Care Community Health*. 2012;3:265-74.
10. Ross AJ, Hyatt BM, O'Connor A, Ash AS, Refsum JJ, Berkowitz DR. Patient characteristics associated with oral anticoagulation control results of the Veterans Affairs Study to Improve Anticoagulation (NAVIA). *J Thromb Haemost*. 2010;9:2183-91.
11. Darnellou C, Bailey SC, Durling NE, Shilliday BE, Bowen LC, Darnellou SA, Michaels EL. The association of health literacy with time in therapeutic range for patients on warfarin therapy. *J Health Commun*. 2014;19 Suppl 2:1-38.
12. Brandel VK, Wang F, Brindman AB, Schilling D. Quality of anticoagulation control: do race and language matter? *J Health Care Underw*. 2004;18:1-55.
13. Shen AY, Yoo JF, Lee SS, Jorgensen MJ, Wang X, Chen W. Racial/Ethnic differences in ischemic stroke rates and the efficacy of warfarin among patients with atrial fibrillation. *Stroke*. 2009;40:2236-43.

14. Minawaat B, Connolly RJ, Holmes LM, Cuddy SM, Bhattacharya JM, Yusuf S, Connolly SJ. Quality of individual INR control and the risk of stroke and bleeding events in atrial fibrillation patients: a nested case-control analysis of the ACTIVEW study. *Thromb Res*. 2012;129:15–8.
15. Tadaishi H, Willemsen GH, Padini H, Echtem H, CYPACI and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin. *Amelitis yet d'Amelias*. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:276–80.
16. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson H, Jorgensen AL, Tsch CH, Nicholson T, Keesen P, Christensen C, Willemsen G, Sallberg C, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med*. 2013;369:2294–303.
17. Van Schie RM, Weesels JA, le Cessie S, de Boer A, Schellekens T, van der Meer FJ, Vahsel T, van Meegen E, Rosendaal FR, Meilander-van der Zee AH. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J*. 2015;36:1908–17.
18. Verhoef TJ, Riga G, de Boer A, Bazillon B, Bokros G, Bokros Y, Konstantinides S, Le Cessie S, Molassus E, van der Meer FA, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N Engl J Med*. 2013;369:2304–12.
19. Gage BF, Day C, Johnson JA, Daye E, Helder MJ, Rieder PM, Milligan PE, Gage G, Lenzini P, Riddle ME, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84:206–11.
20. Kimmel SE, French B, Kerner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, Rosendaal FR, Day C, Medigan RA, McIlwain RB, et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med*. 2013;369:2289–98.
21. Santos PC, Marcatto LR, Duarte ME, Soares RA, Steiner CM, Scavone M, Meyer JE, Pereira AC. Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration. *Pharmacogenomics*. 2015;16(6):61–12.
22. Pervini A, Alshahid SH, Rupasingh Y, Kumar TR, Mahapatra AR, Pringle RB, Mehra RC, Rutala VR. Optimization of warfarin dose by population-specific pharmacogenomic algorithm. *Pharmacogenomics*. 2012;13:105–11.
23. Bédaride SM, Bouchard S, Bouchard SA, Abou-Yousof HS. Validation of a proposed warfarin dosing algorithm based on the genetic make-up of Egyptian patients. *Mol Diagn Ther*. 2014;17:381–90.
24. Cho ML, Oh YK, Bang CY, Kim JM, Kim W, Ko JW, Kim JS, Lee SY. Development and comparison of a warfarin-dosing algorithm for Korean patients with atrial fibrillation. *Clin Ther*. 2011;33:1571–80.
25. Young S, Mahapatra L, Twiss L, Dillon C, Havelok J, O'Shea P. Comparison of pharmacist managed anticoagulation with usual medical care in a family medicine clinic. *BMC Fam Pract*. 2011;12:288.
26. Centemirli DE, Pattison HA, Lip GY, Lane DA. Educational intervention improves anticoagulation control in atrial fibrillation patients: the TREAT randomized trial. *PLoS One*. 2013;8(4):e74087.
27. Ogasawara Y, Matsuo M, Matsuo H, Sakaguchi Y, Takai H, Horiguchi Y, Ryomoto T, Adachi S, Amano T, Tagawa M, et al. Introduction of point-of-care testing in Japanese outpatient clinics is associated with improvement in time in therapeutic range in anticoagulant-treated patients. *Circ J*. 2014;78:1342–8.
28. Liew JA, McCabe S, Rodi JA, Miles TP. Cost-effectiveness of genotype-guided warfarin therapy for anticoagulation in elderly patients with atrial fibrillation. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2009;11:27–33.
29. Chang HY, Seabaw S, Dammongkorn K, Permauwat M, Wu DL, Sittira P, Chuekumporn N. Cost-effectiveness analysis of pharmacogenetic-guided warfarin dosing in Thailand. *Thromb Res*. 2014;134:1279–84.
30. Echeverri MH, Rosner J, Greenberg SM, Edge BF. Cost-effectiveness of using pharmacogenetic information in warfarin dosing for patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2009;150:73–81.
31. Ansell J, Hohn J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palarek G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists. *American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines* (8th Edition). *Chest*. 2008;133:1605–28.
32. Cushman M, Lin W, Zallat N. 2011. *Clinical Practice Guide on Anticoagulant Dosing and Management of Anticoagulant Associated Bleeding Complications in Adults*. Washington: American Society of Hematology (8th Edition); 2011.
33. Guyer GH, Ad BA, Crowther M, Cushman DO, Schumacher ML. Baseline summary: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. 8th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141:33–43.
34. Horton JD, Bushwick BM. Warfarin therapy: evolving strategies in anticoagulation. *Am Fam Physician*. 1999;59:685–90.
35. Datal GE. Randomizedcontrolled. 2008. <http://randomizedcontrolled.com/>. Accessed 10 Sept 2015.
36. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Blot E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*. 1993;69:686–9.
37. Gage BF, Waterman AD, Shannon W, Bouillon M, Rich MW, Rufford ML. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*. 2001;286:2664–70.
38. Lip GY, Minawaat B, Pisters R, Lane DA, Crijns HL. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010;137:263–72.
39. Pisters R, Lane DA, Meuwinkel R, de Voer CB, Crijns HL, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*. 2010;138:1059–108.
40. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Cinde JE. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42:377–81.
41. Soares BA, Santos PC, Machado-Goncalves GL, Nogueira RM, Mill JE, Krieger JE, Pereira AC. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms are differently distributed in the Brazilian population according to self-declared ethnicity or genetic ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16:487–93.
42. Santos PC, Ribeiro CL, Schmitt IT, Soares BA, Kawabata-Machihara L, Bressan RM, Krieger JE, Lotufo PA, Pereira AC. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;85(4):789–97.
43. Zhai L, Parnowski M, Woodcock J. Pharmacogenetics and coumarin dosing—reconciling expectations. *N Engl J Med*. 2013;369:2775–5.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit