Letícia Camargo Tavares

**Avaliação do impacto da inclusão de polimorfismos nos genes *ABCB1* e
CYP4F2 em algoritmo farmacogenético para dosagem personalizada
do anticoagulante varfarina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
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

**São Paulo
2019**

Letícia Camargo Tavares

Avaliação do impacto da inclusão de polimorfismos nos genes *ABCB1* e *CYP4F2* em algoritmo farmacogenético para dosagem personalizada do anticoagulante varfarina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para 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 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Leticia Camargo

Avaliação do impacto da inclusão de polimorfismos nos genes *ABCB1* e *CYP4F2*
em algoritmo farmacogenético para dosagem personalizada do anticoagulante varfarina
/ Leticia Camargo Tavares -- São Paulo, 2019.

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.Varfarina/administração & dosagem 2.Farmacogenética
3.Algoritmos 4.Poliformismo genético 5.Membro 1 da subfamília B de cassetes de
ligação de ATP 6.Sistema enzimático do citocromo P-450

USP/FM/DBD-085/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, Clóe e Marco, pelo apoio e suporte incondicionais.

Ao meu irmão Leonardo, por todo incentivo e carinho despendidos.

À minha amada Gabriela, pelo companheirismo, amizade, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Caleb,

agradeço enormemente pela confiança que sempre me foi depositada e pelas tantas oportunidades que me ofereceu nesse período de mestrado, sempre acreditando em meu potencial como cientista. Sem dúvidas, a sua orientação foi essencial para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus pais Clóe e Marco e meu irmão Leonardo,

agradeço por chorarem com meus choros, sorrirem com meus sorrisos e celebrarem minhas conquistas. Eu sou imensamente grata por ter uma família que me incentiva em meus desejos e apoia as minhas decisões, sempre me auxiliando a ponderar os prós e os contras. Obrigada por nunca terem medido esforços pela minha felicidade e bem-estar. Eu espero ser para vocês tudo aquilo que vocês significam para mim.

À minha amada Gabriela,

obrigada por estar presente por tanto tempo em minha vida, compartilhando desejos, anseios, medos, dificuldades e conquistas. Sem a sua cumplicidade, o seu companheirismo e o seu amor tudo teria sido mais difícil. Com você a caminhada é mais leve e conquistaremos, juntas, tudo aquilo que almejamos.

Aos meus companheiros de laboratório e pesquisa e membros do LGCM,

não poderia deixar de agradecer-los pelo acolhimento, conselhos, sugestões e ensinamentos nessa jornada. Obrigada pelas conversas, discussões e risadas diárias.

Às Profas. Dras. Núbia e Luz,

agradeço pelos ensinamentos e auxílio nas metodologias estatísticas utilizadas no presente projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

pela concessão dos recursos financeiros para a execução da presente pesquisa (2013/09295-3) e pela bolsa de mestrado concedida (2016/22507-8).

Às instituições FAPESP, CAPES e CNPq,

agradeço por fomentarem a Ciência brasileira e por todo o apoio financeiro.

*“Everyone you meet is fighting a battle you know nothing about.
Be kind. Always.”*

Brad Meltzer

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. Eventos cardiovasculares	1
1.2. Fármacos anticoagulantes: varfarina e DOACs	2
1.3. Farmacogenética e algoritmo para predição de dose de varfarina	7
1.3.1 Polimorfismo <i>VKORC1</i> c.-1639G>A	8
1.3.2 Polimorfismos <i>CYP2C9</i> *2 e *3	9
1.3.3 Polimorfismo <i>CYP4F2</i> c.1297G>A	13
1.3.4 Polimorfismo <i>ABCB1</i> c.3435C>T	14
1.4. Modelagem estatística	16
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Primário	22
3.2. Secundários	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Casuística	23
4.2. Comitê de ética em pesquisa	23
4.4. Metodologia laboratorial	25
4.4.1. Amostras biológicas	25
4.4.2. Extração e avaliação do DNA genômico	25
4.4.3.a <i>ABCB1</i> c.3435C>T	25

4.4.3.b <i>CYP4F2</i> c.1297G>A	27
4.5. Análise estatística	29
4.6. Fases de derivação, validação e replicação do algoritmo farmacogenético de varfarina	31
5. RESULTADOS	33
5.1. Características gerais das coortes estudadas	33
5.2. Características dos pacientes da 1ª coorte em dose estável de acordo com os genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i>	35
5.3. Avaliação da associação dos polimorfismos em <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> com a variabilidade de dose terapêutica de varfarina	38
5.3.1 Dose estável de varfarina <i>versus</i> genótipos <i>ABCB1</i> c.3435C>T	38
5.3.2 Dose estável de varfarina <i>versus</i> genótipos <i>CYP4F2</i> c.1297G>A	41
5.4. Incorporação dos genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido previamente	43
5.5. Fase de replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina incluindo os genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i>	48
5.6. Utilização de metodologia não-paramétrica para ajustar o algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina	51
6. DISCUSSÕES	56
6.1. Avaliação da associação dos polimorfismos em <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> com a variabilidade de dose terapêutica de varfarina	56
6.2. Incorporação dos genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido previamente	61
6.3. Limitações	66
6.4. Considerações finais	68
7. CONCLUSÕES	70
8. ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FMUSP)	72
ANEXO B – Artigo de coautoria: “ <i>Pharmaceutical care increases time in therapeutic range of patients with poor quality of anticoagulation with warfarin</i> ”	74
9. REFERÊNCIAS	75

APÊNDICE A – Artigo: *“Impact of incorporating ABCB1 and CYP4F2 polymorphisms in a pharmacogenetics-guided warfarin dosing algorithm for the Brazilian population”*

APÊNDICE B – Artigo: *“Association between ABCB1 polymorphism and stable warfarin dose requirements in Brazilian patients”*

APÊNDICE C – Artigo: *“Genotype-guided warfarin therapy: current status”*

APÊNDICE D – Artigo: *“Juvenile hemochromatosis: HAMP mutation and severe iron overload treated with phlebotomies and deferasirox”*

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABCB1	Gene codificador da gp-P
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADA	“ <i>American Diabetes Association</i> ”, Associação Americana de Diabetes
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente vascular cerebral
AVK	Anticoagulantes antagonistas da vitamina K
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPIC	“ <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i> ”, Consórcio da Implementação da Farmacogenética Clínica
CYP2C9	Gene codificador da CYP2C9
CYP2C9	Enzima citocromo P450 2C9
CYP4F2	Gene codificador da CYP4F2
CYP4F2	Enzima citocromo P450 4F2
DAC	Doença arterial coronariana
DCNT	Doença crônica não-transmissível
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Dose observada
DOACs	“ <i>Direct oral anticoagulants</i> ”, Anticoagulantes Orais de Ação Direta
DP	Dose predita
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético

EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EP	Erro padrão
FA	Fibrilação atrial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FT	Fator tecidual
GAMLSS	“ <i>Generalized additive models</i> ”, Modelos aditivos generalizados
GBD	<i>Global Burden of Disease</i>
GGCX	Enzima gama-glutamil carboxilase
gp-P	Glicoproteína-P
GWAS	“ <i>Genome-wide association study</i> ”, Estudo de associação genômica ampla
HC	Hospital das Clínicas
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
ISI	Índice de sensibilidade internacional
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IWPC	“ <i>International Warfarin Pharmacogenetics Consortium</i> ”, Consórcio Internacional da Farmacogenética da Varfarina
LGCM	Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
MAF	“ <i>Minor allele frequency</i> ”, Frequência do menor alelo

ME	Metabolizador extensivo - Fenótipo predito por polimorfismos no gene <i>CYP2C9</i>
mg	Miligrama
MI	Metabolizador intermediário - Fenótipo predito por polimorfismos no gene <i>CYP2C9</i>
mL	Mililitro
ML	Metabolizador lento - Fenótipo predito por polimorfismos no gene <i>CYP2C9</i>
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
°C	Grau Celsius
PCR	“ <i>Polymerase chain reaction</i> ”, Reação em cadeia da polimerase
R²	Coeficiente de determinação total
R² parcial	Coeficiente de determinação parcial
RLM	Regressão linear múltipla
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Razão normalizada internacional, “ <i>International normalized ratio</i> ”
RR	Risco relativo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SD	Desvio padrão
SNP	“ <i>Single nucleotide polymorphism</i> ”, Polimorfismo de nucleotídeo único
SQE	Soma quadrática do erro

SQR	Soma quadrática da regressão
SQT	Soma quadrática total
ST4	Distribuição <i>skew</i> -t tipo 4
SUS	Sistema único de saúde
TEP	Embolia pulmonar
TP	Tempo de protrombina
TTR	“ <i>Time in therapeutic range</i> ”, Tempo na faixa terapêutica
TVP	Trombose venosa profunda
VKOR	Enzima vitamina K epóxi-redutase
VKORC1	Gene codificador da VKOR
VKR	Enzima vitamina K redutase
β	Coeficiente de regressão
μL	Microlitro
ρ	Coeficiente de correlação de Pearson

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para amplificação da cadeia de polimerase para genotipagem do polimorfismo <i>ABCB1</i> c.3435C>T.	26
Tabela 2. Características demográficas, clínicas e genéticas das coortes estudadas.	34
Tabela 3. Características demográficas, clínicas e genéticas dos pacientes da 1ª coorte em dose estável (n=309) de acordo com os genótipos a) <i>ABCB1</i> c.3435C>T e b) <i>CYP4F2</i> c.1297G>A.	36
Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de interesse nos genes <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> dos pacientes da 1ª coorte em dose estável de varfarina, de acordo com subgrupos raciais autodeclarados (não-brancos e brancos).	37
Tabela 5. Doses de varfarina preditas pelos modelos de regressão linear ajustados utilizando os genótipos <i>ABCB1</i> como covariáveis.	40
Tabela 6. Doses de varfarina preditas pelos modelos de regressão linear ajustados utilizando os genótipos <i>CYP4F2</i> como covariáveis.	42
Tabela 7. Coeficientes β médios, significância (valor P) e coeficiente parcial de determinação (R^2 parcial) de cada covariável dos algoritmos farmacogenéticos de dosagem de varfarina com e sem os genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> (amostra de derivação, n=309).	44
Tabela 8. Coeficientes médios e significância (valor P) de cada covariável do algoritmo farmacogenético de dosagem de varfarina, ajustado a partir da distribuição <i>skew-t</i> tipo 4 (ST4) (2ª coorte, n=133).	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação da varfarina.	3
Figura 2. Exemplos de amostras genotipadas para o polimorfismo <i>ABCB1</i> c.3435C>T, a partir da técnica de PCR-HRM.	27
Figura 3. Exemplos de amostras genotipadas para o polimorfismo <i>CYP4F2</i> c.1297G>A, a partir de ensaio TaqMan®.	29
Figura 4. Desenho do estudo: fases de derivação, validação e replicação do algoritmo farmacogenético de dosagem de varfarina.	32
Figura 5. Doses médias de varfarina (em mg/semana) de acordo com genótipos <i>ABCB1</i> c.3435C>T em pacientes em tratamento anticoagulante estável (1ª coorte, n=309).	39
Figura 6. Doses médias de varfarina (em mg/semana) de acordo com genótipos <i>CYP4F2</i> c.1297G>A em pacientes em tratamento anticoagulante estável (1ª coorte, n=309).	41
Figura 7. Histograma (à esquerda) e <i>boxplot</i> (à direita) mostram a distribuição normalizada dos coeficientes de determinação (R^2) dos algoritmos a) com e b) sem os genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> (amostra de derivação, n=309).	46
Figura 8. Comparação dos coeficientes de correlação de Pearson (ρ) entre a dose observada de varfarina (DO) e a dose predita (DP) pelos algoritmos a) com ($\rho=0,614$) e b) sem ($\rho=0,597$) os genótipos <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> (amostra de derivação, n=309).	47
Figura 9. Comparação entre a dose predita (DP) e dose observada (DO) a) <i>boxplot</i> b) <i>scatterplot</i> do erro relativo da predição, $ERP = (DP - DO)/DP$, do modelo com as variantes <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> versus DO (amostra de derivação, n=309).	48
Figura 10. Replicação do algoritmo. Correlação de Pearson entre a dose predita (DP) e dose observada (DO): a) presente estudo; b) Santos; c) IWPC; d) Perini; e) Botton f) com e f) sem os polimorfismos <i>CYP4F2</i> , <i>F2</i> e haplótipos <i>VKORC1</i> (amostra de replicação, n=133).	49
Figura 11. Comparação entre a dose predita (DP) e dose observada (DO) a) <i>boxplot</i> b) <i>scatterplot</i> do erro relativo da predição, $ERP = (DP - DO)/DP$, do modelo com as variantes <i>ABCB1</i> e <i>CYP4F2</i> versus DO (amostra de replicação, n=133).	50

Figura 12. Distribuição da dose de varfarina observada para o grupo de replicação51
(n=133) **a)** histograma **b)** gráfico Q-Q.

Figura 13. Comparação entre a distribuição da dose semanal observada (2^a coorte,52
n=133) e diversas distribuições da família GAMLSS.

Figura 14. Resíduos gerados a partir do ajuste do modelo utilizando a distribuição ST453
a) histograma **b)** gráfico Q-Q.

Figura 15. a) Comparação entre as doses preditas (DP) pelos modelos ST4 e RLM e a55
dose observada (DO) **b)** Diferença entre os erros quadráticos das dosagens preditas pelos
modelos ST4 e RLM (n=133).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fórmula do RNI.	4
Quadro 2. Fórmula do modelo de regressão linear múltipla.	16
Quadro 3. Fórmula do resíduo (ε).	17
Quadro 4. Fórmula do coeficiente de determinação total (R^2) e parcial (R^2_{parcial}).	17

RESUMO

Tavares LC. *Avaliação do impacto da inclusão de polimorfismos nos genes ABCB1 e CYP4F2 em algoritmo farmacogenético para dosagem personalizada do anticoagulante varfarina* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O anticoagulante oral cumarínico varfarina é vastamente utilizado para o tratamento e prevenção de eventos tromboembólicos, que configuram uma das principais causas de mortalidade mundial. Contudo, de acordo com fatores genéticos e ambientais, os cumarínicos apresentam grande variação em sua farmacocinética e farmacodinâmica, implicando em respostas variáveis entre os indivíduos. Para auxílio na tomada de decisão pelo corpo clínico na terapia com a varfarina, algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose têm sido extensivamente estudados e desenvolvidos, com o intuito de estabelecer terapias personalizadas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos investigar a associação de polimorfismos nos genes *ABCB1* e *CYP4F2* com a variabilidade do requerimento de dose de varfarina, e, primariamente, avaliar o impacto da inclusão desses polimorfismos como covariáveis do algoritmo farmacogenético estimador de dosagem de varfarina previamente desenvolvido para a população brasileira por Santos *et al.* (2015). Neste estudo retrospectivo, foram utilizadas amostras de 965 pacientes registrados no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). As genotipagens dos polimorfismos *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A foram realizadas por meio da amplificação do DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase seguida por análise de curva de dissociação (PCR-HRM) ou ensaio TaqMan®, respectivamente para cada variante. Para as análises estatísticas, utilizamos a abordagem de regressão linear múltipla, considerando a dose estável de varfarina como variável resposta e como covariáveis os polimorfismos de interesse nos genes *ABCB1* e *CYP4F2*, bem como outros fatores genéticos, clínicos e demográficos. Nossos resultados sugerem que carreadores da variante *ABCB1* c.3435C>T requerem doses médias de manutenção de varfarina inferiores quando comparados aos indivíduos com genótipo selvagem (redução de 2,5 e 4,3 mg/semana, respectivamente para carreadores dos genótipos CT e TT). Ainda, observamos uma grande variabilidade de dose de varfarina no subgrupo de pacientes autodeclarados não-brancos, de acordo com os genótipos *ABCB1* (redução de 5,5 e 10,2 mg/semana, respectivamente para carreadores dos genótipos CT e TT). Além disso, verificamos que ambos os polimorfismos *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A contribuíram para a predição de dose de varfarina, quando associados a outros fatores genotípicos, demográficos e clínicos relevantes, sendo estatisticamente significativos, aumentando o coeficiente de determinação do algoritmo em 2,6% e explicando um adicional de 3,6% da variabilidade interindividual de dosagem. Em conclusão, demonstramos que as genotipagens das variantes *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A podem ser relevantes para acurar a terapêutica com varfarina na população brasileira.

Descritores: Varfarina/administração & dosagem; Farmacogenética; Algoritmos; Polimorfismo genético; Membro 1 da subfamília B de cassetes de ligação de ATP; Sistema enzimático do citocromo P-450

ABSTRACT

Tavares LC. *Impact evaluation of incorporating ABCB1 and CYP4F2 polymorphisms in a genetic-guided warfarin dosing algorithm*. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

The coumarin oral anticoagulant warfarin has been widely used for treating and preventing thromboembolic events, which are one of the main causes of mortality worldwide. However, according to genetic and environmental factors, coumarins show high variance in pharmacokinetics and pharmacodynamics, resulting in variable interindividual responses. For supporting warfarin clinical decisions, genetic-guided algorithms have been extensively studied and developed, in order to set personalized therapeutics. In this context, the aims of this master's research project were to investigate the association of *ABCB1* and *CYP4F2* polymorphisms with individual's warfarin dose requirements and to assess the impact of the inclusion of these polymorphisms as covariates in the genetic-guided dosing algorithm developed by Santos PC *et al.* (2015) for the Brazilian population. For this retrospective study, 965 patients enrolled in the Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School (FMUSP) were involved. Genotyping of *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A were performed by genomic DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR), followed by melting curve analysis (HRM-PCR) and TaqMan® assay, respectively. For statistical analysis, we utilized multiple linear regression approach considering warfarin stable dose as the dependent variable and the *ABCB1* and *CYP4F2* variants, as well as other genetic, clinical and demographic factors as covariates. Our data suggests that carriers of *ABCB1* c.3435C>T genotypes require lower mean warfarin maintenance doses when compared to wild-type individuals (reduction of 2.5 and 4.3 mg/week, respectively for CT and TT genotype carriers). Furthermore, we observed large warfarin dose variability for the subgroup of patients who self-declared themselves as non-white according to *ABCB1* genotypes (lowering of 5.5 and 10.2 mg/week, respectively for CT and TT genotype carriers). Finally, we verified that both *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A polymorphisms were able to contribute to warfarin dose prediction, when associated to other relevant genetic, clinical and demographic data, being statistically significant, improving the algorithm's coefficient of determination by 2.6% and explaining an additional of 3.6% of the interindividual warfarin dosage variability. In conclusion, in this study we have demonstrated that the genotyping of *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A may be relevant for improving the management of warfarin therapeutics in Brazilian patients.

Descriptors: Warfarin/administration & dosage; Pharmacogenetics; Algorithms; Genetic polymorphisms; ATP-binding cassette sub-family B member 1; Cytochrome P-450 enzyme system

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eventos cardiovasculares

Em circunstâncias normais, em resposta à lesão de um vaso sanguíneo, o processo hemostático, definido como a resposta fisiológica do organismo que tem como finalidade prevenir ou cessar um evento hemorrágico, induz a coagulação para que ocorra a recuperação do vaso sanguíneo lesionado. Esse processo é complexo e requer a ação combinada de múltiplos mecanismos reguladores, que envolvem fatores vasculares, plaquetários e plasmáticos. Ocasionalmente, uma resposta hemostática exacerbada pode levar à coagulabilidade excessiva, implicando, por exemplo, em condições tromboembólicas. Tais condições, que consistem na formação de trombos ou êmbolos, podem, por exemplo, ocorrer devido a uma concentração plasmática aumentada de fatores de coagulação (fator V, VII, VIII, IX, fibrinogênio). Assim, para prevenção e terapia de eventos tromboembólicos são recomendados fármacos que atuam direta ou indiretamente sobre a cascata de coagulação, de forma a inibi-la: os chamados fármacos anticoagulantes.

Uma condição tromboembólica pode acarretar eventos cardiovasculares graves, tais como: infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (TEP), que ocorrem devido à obstrução de vasos sanguíneos. Ainda, certas doenças apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de condições tromboembólicas, tais como: doenças inflamatórias intestinais, cânceres, IAM, insuficiência respiratória, insuficiência cardíaca classe funcional III ou IV, síndrome

nefrótica, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrilação atrial (FA) e doença arterial coronariana (DAC).

Nesse contexto, ao longo dos dois últimos séculos, as revoluções tecnológica e industrial levaram a uma mudança do perfil de morbimortalidade populacional, com ampla predominância de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), entre as quais se destacam as doenças cardiovasculares. Atualmente, as doenças cardiovasculares são consideradas as principais causas de mortalidade mundial, respondendo por cerca de 30% do número mundial de óbitos anuais, segundo relatório da Organização Mundial da Saúde ¹⁻³. No Brasil, segundo dados do *Global Burden of Disease* (GBD), a DAC e o AVC estão no topo da lista de principais doenças que levam a morte. Altas taxas de mortalidade são registradas principalmente em grupos vulneráveis da população, como por exemplo cidadãos de baixa escolaridade, baixa renda e de idade avançada, devido a hábitos inadequados de alimentação (como o consumo de alimentos com alto teor de sódio), sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, falta de acesso a um sistema de atenção básica de saúde para controle contínuo de pressão e níveis de colesterol e glicose, entre outros fatores que podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares ^{4,5}. Assim, eventos cardiovasculares acarretam enormes despesas para o Sistema Único de Saúde (SUS), devido à alta demanda de internação, gastos ambulatoriais e hospitalares, bem como sobrecarregam a previdência social ².

1.2. Fármacos anticoagulantes: varfarina e DOACs

Nesse cenário, nos últimos 65 anos a varfarina tem sido o anticoagulante oral mais comumente prescrito na prática clínica mundial para prevenções primária e secundária de

eventos cardiovasculares adversos, tais como TVP, embolia sistêmica, AVC, IAM e recorrência de infarto ⁶⁻⁸. Seu mecanismo de ação consiste em bloquear a regeneração da vitamina K, que age como cofator da carboxilação de diversos fatores de coagulação (II, VII, IX e X) e proteínas que auxiliam na regulação anticoagulante (C, S e Z), como sumarizado na **Figura 1**. Sendo assim, a varfarina faz parte da classe de fármacos anticoagulantes conhecidos como antagonistas da vitamina K (AVK) ⁹.

Figura 1. Mecanismo de ação da varfarina: a partir da inibição da enzima vitamina K epóxi-redutase (VKOR), os AVKs inibem a formação da hidroquinona (forma reduzida da vitamina K, também conhecida por KH_2) que atua como cofator da enzima γ -glutamil carboxilase (GGCX), responsável pela carboxilação de resíduos de ácido glutâmico (Glu) e consequente ativação de fatores de coagulação (especificamente II, VII, IX e X), bem como de proteínas que auxiliam na regulação anticoagulante (C, S e Z). Assim, a varfarina acarreta inibição indireta da cascata de coagulação. Fonte: Tavares LC, Marcatto LR e Santos PCJL (2018)¹⁰.

Apesar da varfarina ser comprovadamente eficaz quando administrada dentro dos parâmetros ideais, a farmacodinâmica e a farmacocinética desse fármaco são amplamente influenciadas por fatores genéticos, demográficos, bem como por interações alimentares e medicamentosas, o que implica em grande variação intra- e interindividual na resposta terapêutica ^{7,10-12}. Assim, existe grande dificuldade em estabelecer a dosagem adequada a ser administrada pelo paciente, que pode variar de 1 a 20 mg/dia, ou mais, a depender do indivíduo ¹³⁻¹⁵. Atrelado a isso, a varfarina possui uma estreita faixa terapêutica ^{16,17}, elevando os riscos de ocorrência de eventos adversos, como tromboembólicos e hemorrágicos, em virtude de uma baixa resposta anticoagulante ou de uma ação anticoagulante excessiva, respectivamente ^{18,19}. Dessa forma, há a necessidade de monitoramento regular em relação à terapia anticoagulante com varfarina.

Essa avaliação é baseada no monitoramento do tempo de coagulação da protrombina (TP), indiretamente medido através do parâmetro preconizado pela OMS: a Razão Normalizada Internacional (RNI), descrito pela fórmula a seguir (**Quadro 1**).

Quadro 1. Fórmula do RNI. TP: tempo de protrombina do paciente; TP_c: tempo de protrombina da amostra controle; ISI: Índice de Sensibilidade Internacional. O valor de ISI é determinado pelo fabricante do reagente de tromboplastina utilizado para o procedimento experimental, que pode variar de lote para lote.

$$\text{RNI} = \left(\frac{\text{TP}}{\text{TP}_c} \right)^{\text{ISI}}$$

A faixa terapêutica ideal de RNI varia de acordo com a indicação ao tratamento com varfarina, de forma que, para a maioria delas, recomenda-se uma janela de RNI entre 2 e 3.

No entanto, para pacientes com alto risco de trombose, como por exemplo aqueles que possuem válvula mecânica, a faixa terapêutica recomendada é superior (2,5 - 3,5) ^{6,20,21}.

Geralmente, a prescrição inicial da dose diária de varfarina é fixada em 5 mg, podendo variar de acordo com o risco de sangramento apresentado pelo paciente. Em consultas posteriores, o ajuste da dose de manutenção de varfarina é realizado a partir do resultado de RNI apresentado pelo paciente: em caso de RNI fora da faixa terapêutica, de 5% (0,25 mg/dia) a 20% (1 mg/dia) de aumento ou diminuição da dose podem ser necessários, dependendo do risco apresentado de eventos hemorrágicos ou tromboembólicos ^{13,22,23}. Em casos específicos de alto risco, um aumento ou diminuição de mais de 20% da dose inicial podem ser requeridos. A qualidade da terapia anticoagulante é medida através do parâmetro Tempo na Faixa Terapêutica (TTR, do inglês, “*Time in Therapeutic Range*”) ^{24,25}, de forma que é considerada estável e bem controlada caso o paciente apresente os valores de RNI dentro da faixa terapêutica alvo em pelo menos 60% do tempo ²⁶.

Desde 2010, além da varfarina existem anticoagulantes orais de ação direta (DOACs, do inglês “*Direct Oral Anticoagulants*”) disponíveis e aprovados para uso terapêutico pelo FDA (do inglês, “*Food and Drug Administration*”) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), como por exemplo o etexilato de dabigatrana, a rivaroxabana e a apixabana ²⁷. Diferentemente dos AVKs, os DOACs agem através de um mecanismo de ação que inibe diretamente os sítios de ativação dos fatores de coagulação Xa ou IIa, bloqueando diretamente a cascata de coagulação.

Apesar de os DOACs apresentarem um maior perfil de segurança em relação à varfarina, devido a maior estabilidade farmacodinâmica e farmacocinética, maior faixa

terapêutica, baixas interações alimentícia e medicamentosa, bem como prescrição de dose fixa, Scanavacca e Darrieux (2016) relatam que a varfarina é, até hoje, o único fármaco com eficácia comprovada em pacientes com estenose mitral, portadores de próteses valvares metálicas ou que possuem insuficiência renal crônica ²⁸. Além disso, até hoje não há disponível para comercialização antídotos comprovadamente capazes de reverter o efeito anticoagulante de todos os DOACs, de forma que eventos hemorrágicos, decorrentes de uma superdosagem, ou até mesmo a necessidade de uma intervenção cirúrgica, dependem da espera do fim da ação desses fármacos que varia de 24 a 36 horas, o que configura uma importante limitação ao uso desses medicamentos. Adicionalmente, ainda não foi estabelecido um parâmetro efetivo para o monitoramento da terapia com DOACs, como é feito o controle da anticoagulação pelo RNI para a terapia com varfarina ^{9,27-29}.

Outra importante limitação do uso dos DOACs em relação ao uso de varfarina é a financeira. Atualmente, os custos dos anticoagulantes orais de ação direta são consideravelmente superiores em comparação ao da varfarina. Por exemplo, no Brasil, a rivaroxabana tem um custo médio atual de R\$175,00 (20 mg, 28 comprimidos), enquanto a varfarina possui preço médio de R\$15,00 (5 mg, 30 comprimidos), sendo que a dose de varfarina varia de 1 a 20 mg/dia a depender do indivíduo, enquanto a dose recomendada de rivaroxabana varia de 10 a 20 mg/dia, de acordo com a indicação clínica ^{30,31}. Assim, o elevado custo dos DOACs pode dificultar a manutenção do tratamento por pessoas de baixa renda, uma vez que esses, até o momento, não são fornecidos aos pacientes que dependem dos serviços públicos de saúde.

A partir de tais evidências, conclui-se que apesar de uma maior variedade de anticoagulantes disponíveis atualmente, ainda não há, até o presente momento, um anticoagulante ideal que não necessite de monitoramento e que apresente administração via oral, posologia simplificada, farmacocinética e farmacodinâmica previsíveis, baixa interação medicamentosa e alimentícia, antídoto específico e preço acessível. Sendo assim, a varfarina ainda continua sendo a opção mais comumente adotada na prática clínica para terapia antitrombótica no âmbito do sistema público de saúde brasileira.

Dessa forma, vê-se a necessidade do desenvolvimento de métodos que melhorem a segurança da terapia com varfarina. Para auxílio na tomada de decisão pelo corpo clínico na terapia com a varfarina, algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose têm sido vastamente propostos e desenvolvidos para diversas populações, com o intuito de aprimorar a terapia anticoagulante com varfarina através da personalização terapêutica, de acordo com as diferenças nas características genéticas, clínicas e demográficas dos indivíduos ³²⁻³⁶.

1.3. Farmacogenética e algoritmo para predição de dose de varfarina

A farmacogenética (ou farmacogenômica) é a área científica que estuda a influência de fatores genéticos sobre as variações individuais nas respostas aos medicamentos, tanto em relação a polimorfismos genéticos que alteram a farmacocinética de fármacos (absorção, transporte, metabolismo, distribuição e eliminação), quanto aqueles que afetam a farmacodinâmica. Essa tem por finalidade aprimorar o tratamento através da personalização terapêutica, de acordo com as diferenças nas características genéticas dos indivíduos ³². Sendo assim, visa adequar as estratégias preventivas e terapêuticas adotadas, melhorar a

eficácia e identificar riscos aumentados de efeitos adversos, podendo assim acrescer a sobrevida do paciente e diminuir a frequência de hospitalização ³⁷.

Além de fatores clínicos e demográficos, fatores genéticos são bem descritos na literatura por influenciarem a ação da varfarina ⁷. Em particular, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”), variações genéticas pontuais à nível de nucleotídeo com frequência superior a 1% na população, nos genes *VKORC1* (c.-1639G>A) e *CYP2C9* (*2 e *3) são os principais fatores genéticos que influenciam a resposta/dose de varfarina.

1.3.1 Polimorfismo *VKORC1* c.-1639G>A

O gene *VKORC1* é responsável por codificar a enzima alvo da varfarina (VKOR), e, portanto, está envolvido com a farmacodinâmica desse fármaco. Há evidências de que o polimorfismo c.-1639G>A (rs9923231) presente nesse gene ocasiona um nível diminuído de expressão do mRNA de *VKORC1* ³⁸, de forma que pacientes carreadores do alelo variante c.-1639A necessitam de doses inferiores de varfarina, em relação aos indivíduos carreadores do genótipo selvagem, para apresentarem resposta anticoagulante apropriada ^{11,12,39-41}. A frequência alélica desse SNP varia de acordo com a etnia, sendo que o alelo polimórfico é mais frequentemente encontrado em indivíduos com ancestralidade asiática e europeia, sendo pouco comum em indivíduos afrodescendentes ⁴²⁻⁴⁵. Estudos indicam que pacientes heterozigotos ou homozigotos polimórficos para o rs9923231 tem maior risco, em relação aos indivíduos selvagens, de apresentar um RNI elevado (> 4) no início do tratamento,

quando o método tradicional de ajuste de dose é utilizado. Dessa forma, os pacientes portadores desses genótipos apresentam maior risco de sangramento ⁴⁶⁻⁴⁹.

1.3.2 Polimorfismos *CYP2C9* *2 e *3

O gene *CYP2C9* codifica uma isoenzima pertencente à família do citocromo P450, a *CYP2C9* (família: *CYP2*, subfamília: *C9*), que consiste na principal enzima metabolizadora da varfarina. Dessa forma, tal gene está envolvido com a farmacocinética deste anticoagulante. Os principais polimorfismos presentes no *CYP2C9* associados à sensibilidade à varfarina consistem nas variantes *2 (c.430C>T, rs1799853) e *3 (c.1075A>C, rs1057910), estando correlacionados à metabolização mais lenta da varfarina e, em consequência, à uma necessidade de dose inferior pelos indivíduos polimórficos ⁵⁰. Assim como o *VKORC1* c.1639G>A, as frequências alélicas das variantes *CYP2C9**2 e *3 variam de acordo com a etnia, sendo mais frequentes em caucasianos com ancestralidade europeia ou norte americana ^{12,51-53}. Estudos também demonstram que o grupo de pacientes portadores dessas variantes apresentam maior risco de sangramento ^{49,54-56}.

Nesse sentido, em 2007 o FDA adicionou à bula da varfarina uma tabela farmacogenética que visa correlacionar a dose a ser administrada pelo paciente e os genótipos que envolvem, em especial, os SNPs *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 e *VKORC1* 1639 G>A, para auxílio na tomada de decisão de dose pelo corpo clínico, de acordo com estudos muito bem estabelecidos na literatura ⁵⁷. Tal medida destaca a importância da medicina personalizada,

que leva em conta que indivíduos diferentes podem processar o mesmo fármaco de maneiras diferentes, necessitando assim de doses distintas.

Apesar de a tabela farmacogenética se mostrar uma ferramenta útil e mais acurada para o estabelecimento de dose de varfarina quando comparada ao método tradicional (baseado apenas nos valores de RNI apresentados pelo paciente), os algoritmos farmacogenéticos, que consistem em fórmulas matemáticas usualmente derivadas a partir do método estatístico de regressão linear multivariada, incorporam variáveis demográficas (como idade, gênero, peso e altura), variáveis clínicas (como o uso concomitante de outros medicamentos), bem como variáveis genéticas relevantes como preditores de dose, se mostrando ainda mais acurados. Por exemplo, Finkelman *et al.* (2011) encontraram em seu estudo que algoritmos farmacogenéticos de predição de dose apresentaram maior acurácia (52%) tanto quando comparados ao método tradicional utilizado para o estabelecimento de dose de varfarina (37%), quanto em relação à tabela farmacogenética disponível na bula da varfarina pelo FDA (43%) ($P < 0,001$)⁵⁸. Desde então, com a intenção de melhorar a terapia e segurança da varfarina, algoritmos farmacogenéticos para diversas populações têm sido propostos na literatura^{34,36,59,60}.

A aplicação na prática clínica de tais modelos de predição de dose de varfarina tem sido avaliada em estudos clínicos randomizados, e muitos deles têm revelado resultados promissores em relação à diminuição de eventos adversos (hemorrágicos e tromboembólicos), maior tempo de terapia dentro da faixa terapêutica e menor tempo para alcançar um RNI estável quando os algoritmos farmacogenéticos são comparados ao método tradicional de ajuste de dosagem⁶¹⁻⁶⁹. Por exemplo, o estudo CoumaGen II mostrou que, em relação aos pacientes submetidos ao método clínico tradicional para estabelecimento de dose

de varfarina, uma menor porcentagem de pacientes com dose ajustada a partir de algoritmos farmacogenéticos apresentou $RNI \leq 1,5$ ou ≥ 4 , exibindo menos eventos adversos ⁶⁶. Corroborando esse resultado, a meta-análise realizada por Franchini e colaboradores sugere que os algoritmos farmacogenéticos são capazes de reduzir a ocorrência de eventos hemorrágicos no início do tratamento com varfarina em aproximadamente 50%, quando comparado ao método clínico tradicional ⁶⁷. Outro estudo indica que, em pacientes que apresentaram acidente vascular cerebral agudo, o algoritmo farmacogenético reduz o tempo requerido para estabilização da terapia com a varfarina na fase inicial de tratamento⁶⁸. Ainda, um estudo recente de Gage (JAMA) e colaboradores encontrou menor risco relativo (RR) de sangramento (RR=0,24; 95% CI= 0,05-1,15), de eventos tromboembólicos (RR=0,85; 95% CI= 0,54-1,34) e de $RNI > 4$ (RR=0,71; 95% CI= 0,51-0,99) no grupo de pacientes submetidos à artroplastia de quadril ou joelho que fez uso de algoritmo farmacogenético de dosagem, iniciando a terapia com varfarina ⁶⁹.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu e publicou em 2015 um algoritmo farmacogenético para predição de dose de varfarina calibrado para a população brasileira ⁷⁰. Para esse estudo, foram incluídos 965 pacientes provenientes da Unidade Clínica de Arritmia e Marca Passo do Instituto do Coração (InCor) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Tal algoritmo incluiu nove variáveis: idade, gênero, índice de massa corporal (IMC), altura, raça/cor autodeclarada, uso concomitante do fármaco amiodarona (fármaco antiarrítmico indicado para a prevenção de recorrência de fibrilação atrial e do *flutter* atrial e um potente vasodilatador que apresenta interação medicamentosa com a varfarina, potencializando o seu efeito), uso de indutores enzimáticos (carbamazepina e fenitoína), diferentes genótipos *VKORC1* c.G1639A, bem

como fenótipos metabólicos de polimorfismos no gene *CYP2C9* (*CYP2C9**2 c.445C>T e *CYP2C9**3 c.1100A>C), e apresentou coeficiente de determinação total (R^2) de 39%. Baixos valores de R^2 (de 35 a 50%) estão usualmente associados a populações etnicamente miscigenadas, como é o caso da população brasileira, enquanto que maiores valores de R^2 (50 a 65%) são mais facilmente alcançados em algoritmos desenvolvidos para populações homogêneas de ascendência europeia ^{71,72}. Variáveis como uso de estatina, uso de inibidores da bomba de prótons, indicação para tratamento ou uso de cigarro, não melhoraram o desempenho do algoritmo e não demonstraram valores P significativos para ajuste do modelo de regressão linear simples e múltipla. Atualmente, esse algoritmo está sendo avaliado em um estudo clínico randomizado em pacientes com fibrilação atrial ⁷³.

Na maioria dos algoritmos as variáveis demográficas explicam, em geral, aproximadamente 25% da variabilidade na dosagem de varfarina, enquanto as variáveis genéticas (em especial, SNPs nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*) explicam um adicional de 35 a 50% dessa variabilidade ⁷⁴, evidenciando que os fatores genéticos possuem grande peso na predição de dose de varfarina, inclusive maior do que o de fatores clínicos e demográficos em conjunto. Dessa forma, nos últimos anos tem havido um aumento no interesse em investigar fatores genéticos adicionais que possam explicar ainda mais essa variabilidade no requerimento de dose em diversas populações.

Assim, variações genéticas que interferem no ciclo ou metabolismo da vitamina K, bem como na farmacodinâmica ou farmacocinética da varfarina são candidatas plausíveis para estarem associados com a variabilidade de dosagem requerida desse anticoagulante, como por exemplo polimorfismos presentes nos genes *CYP4F2*, *EPHX1*, *GGCX1*, *ABCB1*, *APOE*, *CALU*, *fator VII*, *PZ*, entre outros ⁷⁵⁻⁸⁷. Em particular, no presente estudo focamos

em investigar polimorfismos presentes no gene *CYP4F2* e *ABCB1*, relacionados ao metabolismo da vitamina K e à farmacocinética da varfarina, respectivamente.

1.3.3 Polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A

O gene *CYP4F2* também codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450, a enzima CYP4F2 (família: CYP4, subfamília: F2), que está relacionada à metabolização da vitamina K no fígado. Essa enzima é capaz de oxidar a vitamina K através de hidroxilação de sua cadeia lateral fitil, interferindo na reciclagem desta vitamina ⁸⁸.

Estudos sugerem que pacientes portadores do SNP c.1297G>A (rs2108622), no gene *CYP4F2*, possuem elevados níveis hepáticos de vitamina K, necessitando assim de uma maior dose de varfarina para apropriada resposta anticoagulante ^{76,89,90}. Este polimorfismo leva à substituição do aminoácido valina por metionina na posição 433 da proteína CYP4F2, podendo ser representado por p.Val433Met ou simplesmente V433M, de forma que indivíduos com essa variante possuem capacidades reduzidas de metabolização da vitamina K ⁸⁸. A frequência genotípica do rs2108622 difere entre pessoas de diferentes etnias, sendo o genótipo homozigoto polimórfico AA significativamente mais frequente na população caucasiana (~51%) do que nas demais (Indiana: 17,1%, Japonesa: 7,3%, Africana: 0,39%, por exemplo) ⁹¹.

Através de um estudo de associação genômica ampla (GWAS, do inglês, “*Genome Wide Association Study*”), Takeuchi e colaboradores mostraram que o *CYP4F2* pode ser um dos principais genes envolvidos na variação de dose de varfarina na população sueca, mesmo que com menor efeito na predição de dose do que o *CYP2C9* e *VKORC1* ⁹². Além disso, na

versão atualizada em 2017 da diretriz elaborada pelo Consórcio de Implementação de Farmacogenética Clínica (CPIC, do inglês “*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*”), o polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A foi incluído como um importante fator genético para explicar a variabilidade de resposta da varfarina entre indivíduos, bem como para estimar a dose de varfarina para pacientes a partir dos genótipos, com base em estudos publicados na literatura ¹².

1.3.4 Polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T

Outra variante genética candidata por possivelmente influenciar a dosagem terapêutica de varfarina é o polimorfismo c.3435C>T (rs1045642) no gene *ABCB1*, também conhecido como *MDR1* (“*Multidrug Resistance Gene 1*”, em inglês) ^{79,93,94}.

O gene *ABCB1* codifica uma bomba de efluxo de compostos xenobióticos dependente de ATP chamada glicoproteína-P (gp-P), responsável por limitar a absorção de fármacos administrados por via oral e a excreção de metabólitos pelo fígado e rim, apresentando, principalmente, função de proteção contra compostos potencialmente tóxicos para o organismo ^{95,96}. A gp-P está envolvida com a farmacocinética de diversos fármacos (fármacos cardíacos, agentes anti-câncer, antibióticos, anti-histaminas, entre outros), pois possui ampla substrato-especificidade e está presente em diversos tecidos importantes para excreção, como intestino, fígado e rim ⁹⁷.

Esse gene está localizado no cromossomo 7 (7q21.12) e é altamente polimórfico. Em especial, o rs1045642 está localizado no éxon 26, cuja consequência é a alteração do nucleotídeo citosina por timina. Apesar disso, esse SNP não leva à alteração do códon que

codifica para o aminoácido isoleucina (p.Ile1145= ou I1145I), sendo categorizado como uma mutação sinônima ⁹⁵. Curiosamente, a variante *ABCB1* c.3435C>T tem sido extensivamente estudada e associada com a variabilidade de dosagem de diversos fármacos por, possivelmente, alterar a funcionalidade da pg-P ou expressão ⁹⁷⁻⁹⁹.

Por exemplo, Saraeva *et al.* (2007) reportam que os haplótipos 2677TT/3435TT e 2677GT/3435TT no gene *ABCB1* estão associados com maiores doses de acenocoumarol, AVK que possui bastante similaridade estrutural com a varfarina ¹⁰⁰. Além disso, estudos relatam que a concentração no plasma de metabólitos ativos do fármaco clopidogrel, um anti-agregante plaquetário utilizado no tratamento e prevenção de trombose arterial, difere de acordo com genótipos do rs1045642, sugerindo associação deste polimorfismo, em específico, com a absorção desse fármaco ^{101,102}. Ainda, no estudo de De Oliveira e colaboradores, constatou-se uma possível associação do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T com a dosagem terapêutica de varfarina em pacientes brasileiros com trombofilia ^{78, 88}. No entanto, os resultados dos estudos de associação do polimorfismo rs1045642 com a dosagem terapêutica de varfarina são controversos ^{79,93,94,103}.

O alelo polimórfico c.3435T ocorre com alta prevalência na população caucasiana (cerca de 50%), enquanto o alelo selvagem C possui altas frequências em populações africanas ou afrodescendentes (cerca de 80%), de forma que a frequência genotípica desse polimorfismo varia entre diferentes grupos étnicos ¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Assim, é válido avaliar o impacto farmacogenético desse polimorfismo, em relação à varfarina, na população brasileira que é altamente miscigenada ¹⁰⁵.

1.4. Modelagem estatística

Como citado acima, a metodologia estatística usualmente aplicada para modelar um algoritmo farmacogenético de dosagem é a regressão linear múltipla (RLM). A regressão é um método utilizado para explicar a variação de uma variável dependente (também chamada de variável resposta), através da variação de variáveis independentes (também chamadas de variáveis preditoras ou covariáveis). Para adotar o método RLM, a variável resposta deve apresentar distribuição normal. Pode-se dizer que a regressão é uma explicação de causa que ocorre através da redução de um grande número de variáveis para poucas dimensões, havendo o mínimo de perda de informação e se estabelecendo e detectando os principais padrões de associação, similaridade e correlação entre as variáveis preditoras, de forma a ajustar o melhor modelo por meio da técnica de mínimos quadrados. No caso de as variáveis independentes explicarem suficientemente a variação da variável dependente, o modelo pode ser utilizado para predição.

Um modelo de RLM com k variáveis preditoras $X_1, X_2, \dots, X_k$ e variável resposta Y , é matematicamente formulado por:

Quadro 2. Fórmula do modelo de regressão linear múltipla. $\bar{Y}$: valor predito da variável resposta; β_0 : intercepto; X_k : covariável; β_k : coeficiente de regressão associado à covariável k ; ε : erro residual.

$$\bar{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Os coeficientes de regressão (β_k) representam o acréscimo (caso positivo) ou decréscimo (caso negativo) esperado na variável resposta, quando a covariável (X_k) é acrescida de uma unidade, caso seja quantitativa, ou no caso de ser uma variável categórica,

apresente categoria maior em relação à categoria escolhida como *baseline*, considerando todas as outras covariáveis inalteradas.

Para a validação de um ajuste de RLM, é necessária uma análise de resíduos, que evidencia a significância do modelo e as contribuições das variáveis preditoras. O resíduo é calculado a partir da seguinte fórmula:

Quadro 3. Fórmula do resíduo (ϵ). Y: valor observado da variável resposta; $\bar{Y}$: valor predito da variável resposta.

$$\epsilon = Y - \bar{Y} = Y - \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots \beta_k X_k$$

Caso os resíduos calculados para o banco de dados possuam distribuição normal, média, mediana próximas a zero e variabilidade constante, o modelo é considerado bem ajustado.

Como parâmetro de qualidade do ajuste do modelo, pode-se calcular o coeficiente de determinação total do modelo, bem como o coeficiente de determinação parcial de cada covariável, através das equações:

Quadro 4. Fórmula do coeficiente de determinação total (R^2) e parcial (R^2_{parcial}).

$$R^2 = \frac{SQR}{SQT} = \frac{SQT - SQE}{SQT} = 1 - \frac{SQE}{SQT}$$

$$R^2_{\text{parcial}} = 1 - \frac{SQE(\text{cheio})}{SQE(\text{reduzido})}$$

Onde:

$SQR = \sum (\bar{Y}_i - \bar{y})^2$: soma quadrática da regressão;

$SQE = \sum (Y_i - \bar{Y}_i)^2$: soma quadrática do erro;

$SQT = SSR + SSE = \sum (Y_i - \bar{y})^2$: soma quadrática total;

Y_i : valor observado da variável resposta para o indivíduo i ; $\bar{Y}_i$: valor predito da variável resposta para o indivíduo i ; $\bar{y}$: média da variável resposta no grupo amostral;

Modelo cheio: inclui a covariável de interesse;

Modelo reduzido: exclui apenas a covariável de interesse.

O coeficiente de determinação (R^2) é o parâmetro mais utilizado para avaliar o grau de ajuste da regressão dados. Esse parâmetro mede a porcentagem da variação total da variável resposta explicada pelo modelo de regressão, de forma que quanto mais próximo de 1 melhor é o ajuste e mais acurado é o modelo de predição. Em caso de R^2 nulo, conclui-se que não há relação entre a variável resposta e as covariáveis, ou seja, os β_k são nulos.

O coeficiente de determinação parcial (R^2_{parcial}) mede a porcentagem adicional da variação da variável resposta que pode ser explicada pela covariável de interesse. Para tanto, realiza-se o ajuste do modelo cheio (com todas as covariáveis) e o ajuste do modelo reduzido (sem a covariável de interesse). Mede-se então a razão entre o erro total quadrático do ajuste do modelo cheio e do modelo reduzido e esse valor é subtraído de 1. Caso o erro do modelo cheio aumente em relação ao modelo reduzido, quer dizer que a covariável de interesse não contribui para acurar a predição, de forma que o R^2 parcial possui valor negativo. Caso o erro do modelo cheio diminua em relação ao modelo reduzido, quer dizer que a covariável de interesse contribui para acurar a predição (R^2 parcial possui valor positivo). Assim o R^2

parcial pode assumir valores entre -1 e 1, de forma que quando positivo e quanto mais próximo de 1, a covariável contribui mais para o ajuste e acurácia do modelo.

2. JUSTIFICATIVA

A varfarina é o anticoagulante mais prescrito mundialmente para terapia e prevenção trombótica. Sua eficácia é indiscutível, porém, devido a sua estreita faixa terapêutica, a prescrição de dose não adequada desse medicamento, que varia de pessoa para pessoa, pode levar a efeitos adversos que podem ser fatais, como eventos hemorrágicos ou embólicos. Atualmente, está muito bem estabelecido na literatura que fatores clínicos, demográficos e, principalmente, fatores genéticos explicam a variabilidade interindividual de dose de varfarina. Assim, com o intuito de reduzir a ocorrência de efeitos adversos e aumentar a eficácia e segurança do uso desse medicamento, algoritmos farmacogenéticos preditores de dosagem de varfarina têm sido vastamente propostos na literatura. Esses se mostram promissores e podem representar um grande avanço para a medicina personalizada.

Devido às diferenças entre as populações, os algoritmos devem ser projetados e calibrados de acordo com a população específica para a qual eles serão aplicados. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um algoritmo preditor de dose de varfarina para a população brasileira, contando com amostras de 975 pacientes usuários de varfarina e nove variáveis preditoras genéticas, clínicas e demográficas. Quando aplicado em pacientes brasileiros, tal algoritmo apresentou melhor desempenho quando comparado ao IWPC (algoritmo internacional) e outros dois algoritmos desenvolvidos no Brasil ⁷⁰. No entanto, sua acurácia de predição ainda não é considerada ideal, fazendo-se necessária a investigação de variáveis que levem ao seu aprimoramento.

Assim, é válido investigar em amostras da população brasileira o impacto farmacogenético de dois polimorfismos *ABCB1* (c.3435C>T) e *CYP4F2* (c1297G>A) que são candidatos à apresentar associação com a variabilidade de dose de varfarina, bem como avaliar o impacto da inclusão dessas covariáveis no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido para a população brasileira por Santos *et al.* (2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Primário

- Avaliar o impacto da inclusão das duas variáveis *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A em algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina previamente criado pelo nosso grupo de pesquisa;

3.2. Secundários

- Analisar a associação dos polimorfismos *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A com a variabilidade de dose terapêutica de varfarina;
- Explorar diferentes abordagens de análise das variáveis resposta e preditoras, visando a modelagem estatística de acordo com a distribuição apresentada pelo conjunto de dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Casuística

Para esse estudo retrospectivo, foram utilizadas amostras de 965 pacientes (1ª coorte: n=832 e 2ª coorte: n=133) recrutados em dois períodos distintos: de Sep/2011 a Mar/2012 e de Jan/2014 a Fev/2014, respectivamente, no Instituto do Coração (InCor) - Unidade Clínica de Arritmia e Marca Passo do Instituto do Coração (InCor) e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Todos os pacientes incluídos no estudo faziam uso de varfarina por pelo menos 1 ano. A maioria dos pacientes (59,8%) apresentaram indicação terapêutica para a varfarina devido a fibrilação atrial não-valvar ou *flutter* atrial. Outras indicações incluíram AVC (12,3%), trombose ou embolia (6,3%), prótese valvar mecânica cardíaca (13,8%), entre outras (7,8%). As amostras sanguíneas foram coletadas no Ambulatório do Instituto do Coração de São Paulo (InCor).

4.2. Comitê de ética em pesquisa

Todos os pacientes incluídos nesse estudo assinaram termo de consentimento e o presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (SDC: 4519.17.019, CAPPesq: 0804.10) (Anexo A).

4.3. Delineamentos

As informações gerais e clínicas dos pacientes incluídos nesse estudo foram obtidas através de aplicação de questionário e posterior checagem no prontuário eletrônico do sistema computacional integrado do InCor. Os dados de genotipagens dos polimorfismos *VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231), *CYP2C9**2 (c.430C>T, rs1799853) e *CYP2C9**3 (c.1075A>C, rs1057910) foram obtidos através do estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa ⁷⁰.

Os pacientes foram categorizados em subgrupos de acordo com sua raça/cor autodeclarada, a partir do critério utilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), como brancos, pardos ou negros. Os seguintes critérios de exclusão foram considerados: insuficiência hepática crônica, uso de outros anticoagulantes que não a varfarina, paciente em quimioterapia e alcoolismo. Classificamos como “diabéticos” aqueles pacientes previamente diagnosticados ou diagnosticados no momento de inclusão no estudo, de acordo com os critérios estabelecidos pelas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e da *American Diabetes Association* (ADA) ^{108,109}. Além disso, o status “fumante” foi considerado como uma variável dicotômica (sim/não).

A variável de interesse do presente estudo foi a dose semanal estável de varfarina (em mg), definida como sendo a dose estabelecida pelo médico quando o paciente atingiu a faixa ótima terapêutica de RNI (considerada entre 1,8 a 3,2) em pelo menos três das últimas visitas consecutivas anteriores à inclusão do paciente no estudo. O período entre uma medição de RNI e outra variou, dependendo de quanto tempo o paciente vinha apresentando um RNI estável e também da probabilidade de eventos que poderiam afetar o RNI (intervenção

cirúrgica, por exemplo). Nos casos nos quais o paciente vinha apresentando RNI estável, o mínimo período considerado entre um teste e outro foi de 4 semanas e o máximo de 12 semanas, de acordo com as recomendações de diretrizes internacionais para a conduta do tratamento anticoagulante ^{20,110}.

4.4. Metodologia laboratorial

4.4.1. Amostras biológicas

Foram utilizadas as amostras de DNA previamente coletadas para o projeto de construção do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina ⁷⁰. Foram coletados 20 mL de sangue de cada indivíduo por punção venosa em jejum em tubos a vácuo BD Vacutainer System® com anticoagulante K3-EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA).

4.4.2. Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico por método de precipitação salina, segundo protocolo padronizado.

4.4.3. Genotipagens

4.4.3.a *ABCB1* c.3435C>T

A genotipagem do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T (rs1045642) foi realizada por amplificação do DNA genômico, através da reação em cadeia da polimerase (PCR,

“*Polymerase Chain Reaction*” do inglês), seguida por análise da curva de *melting* (HRM, “*High Resolution Melting*”, do inglês). Para este procedimento, as reações foram preparadas utilizando o robô de pipetagem de alta precisão QIAgility® (Qiagen) e otimizadas no aparelho Rotor Gene 6000® (Qiagen, Courtaboeuf, France), utilizando o reagente fluorescente DNA-intercalante SYTO9® (Invitrogen, Carlsbad, USA).

A reação foi constituída por 1 µL (10 ng) de DNA genômico, 2 µL de tampão de reação (MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 mM), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,6 µL de SYTO9® (1,5 mM), 0,5 U de BioTaq Polimerase DNA (Bio-Química, Brasil) e água para PCR, completando para 10 µL de volume final.

Foram utilizados *primers* elaborados a partir da numeração rs1045642 e desenhados no programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação da cadeia de polimerase para genotipagem do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T, representado como [Y] na região flanqueada descrita, segundo o código de nucleotídeos da IUPAC.

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica
<i>Forward</i>	5'-GGGTGGTGTTCACAGGAAGAG-3'
<i>Reverse</i>	3'-AGGCAGTGACTCGATGAAGG-5'
Região flanqueada do gene <i>ABCB1</i>	5'-CATTGCTGAGAACATTGCCTATGGAGACAACAGCCG GGTGGT GTCACAGGAAGAG AT[Y]GTGAGGGCAGCAAAGGAGGCCAACA TACATG CCTTCATCGAGTCACTGCCT AATGTAAGTCTCTCTTC-3'

Na fase da análise HRM, o aparelho mensurou a fluorescência emitida pela reação a cada aumento de 0,1°C de temperatura. Os nucleotídeos polimórficos geraram padrões de curva diferenciados em relação ao nucleotídeo selvagem, como mostrado na **Figura 2**. Como validação do método HRM, foi realizado o sequenciamento de Sanger de algumas amostras que apresentaram genótipos selvagem, heterozigoto e homozigoto. Todas as amostras sequenciadas apresentaram equivalência dos genótipos preditos através do método HRM.

Figura 2. Exemplos de amostras genotipadas para o polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T, a partir da técnica de PCR-HRM. Genótipos selvagem (CC, em amarelo), heterozigoto (CT, em verde) e homozigoto polimórfico (TT, em azul).

4.4.3.b *CYP4F2* c.1297G>A

A genotipagem para o polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A ([rs2108622](#)) foi realizada através de reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando o ensaio TaqMan® (Applied Biosystems, C__16179493_40).

A reação foi constituída por 1 µL (10 ng) de DNA genômico, 4,0 µL de Master Mix[®] (AmpliTaq Gold[®] DNA polimerase, *Ultra Pure* (UP), desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), ROX[™] *Passive Reference* e componentes do tampão otimizadas), 0,50 µL de Taqman SNP Genotyping Assay (Primers, sondas VIC[®] e FAM[®]), 4,50 µL de H₂O, totalizando um volume de 10,00 µL. As reações foram preparadas utilizando o robô de pipetagem de alta precisão QIAgility (Qiagen) e foram otimizadas no aparelho Rotor Gene 6000[®] (Qiagen, Courtaboeuf, France).

O ensaio TaqMan se baseia na existência de duas sondas desenhadas para detectar especificamente a presença do alelo selvagem ou polimórfico. Estas apresentam em uma de suas extremidades um fluoróforo e na outra um *quencher*. O fluoróforo está ligado na extremidade 5' da sonda e a porção *quencher* está localizado na extremidade 3'. Estas sondas, após se hibridizarem às sequências-alvo, são amplificadas através de uma PCR. Devido a atividade exonuclease 5'→3' da enzima taq DNA polimerase, o fluoróforo e o quencher são clivados das extremidades das sondas, de forma que o fluoróforo emite fluorescência. Cada sonda apresenta um fluoróforo que emite fluorescência em comprimentos de onda distintos. Assim, os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada, a qual é proporcional à quantidade de produto de PCR acumulado, e revelam o genótipo do indivíduo, como exemplificado na **Figura 3**.

Figura 3. Exemplos de amostras genotipadas para o polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A, a partir do ensaio TaqMan® (Applied Biosystems, C__16179493_40). Genótipos selvagem (GG, em amarelo), heterozigoto (GA, em verde) e homozigoto polimórfico (AA, em azul). Curva com marcadores (círculos): sonda VIC; sem marcadores: sonda FAM.

4.5. Análise estatística

Para propósitos de análises descritivas das características gerais da casuística do estudo, as variáveis categóricas estão representadas como porcentagens e variáveis contínuas como média $\pm$ desvio padrão (SD) ou erro padrão (EP) da média.

Os testes Komolgorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram realizados para avaliar a normalidade das distribuições das variáveis de interesse, como por exemplo a dose estável de varfarina. Os testes qui-quadrado ou exato de Fisher foram utilizados para análises comparativas de variáveis categóricas (como por exemplo para o cálculo do Equilíbrio de Hardy–Weinberg). O teste *t* de Student foi utilizado para análises comparativas das coortes em dose estável de variáveis quantitativas (idade, altura, peso, IMC, etc). O teste *one-way*

ANOVA foi utilizado para analisar a dose média de manutenção estável de varfarina de acordo com os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* de interesse. O método *post-hoc* de Tukey HSD (“*Honest Significant Difference*”, do inglês) foi utilizado para identificar os grupos que possuem diferença estatisticamente significativa, através da comparação em pares.

Modelos de regressão linear múltipla (RLM) foram ajustados para a dose estável de varfarina como variável resposta. Consideramos como covariáveis os polimorfismos de interesse *ABCB1* c.3435C>T (CC, CT ou TT – categorizados como 0, 1 e 2, respectivamente) e/ou *CYP4F2* c.1297G>A (GG, GA ou AA – categorizados como 0, 1 e 2, respectivamente), bem como idade (em anos ou décadas), gênero (1, se masculino, caso contrário 0), IMC (em kg/m²), altura (cm), peso (kg), uso de indutores enzimáticos (1 se faz uso, caso contrário 0), raça/cor autodeclarada (branca, parda ou negra – categorizados como 1, 2 e 3, respectivamente), uso de amiodarona (1 se faz uso, caso contrário 0), fenótipos metabolizadores *CYP2C9* (EM ou IM + PM – categorizados como 1 e 2, respectivamente) e genótipos *VKORC1* c.-1639G>A (GG, GA ou AA – categorizados como 0, 1 e 2, respectivamente). O nível de correlação entre as doses preditas (DP) e observadas (OD) foi avaliado a partir do coeficiente de correlação de Pearson (ρ).

O nível de significância considerado foi $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas descritas no presente estudo foram realizadas no programa R (versão 3.4.4) e SPSS *Statistics*[®] (IBM, versão 20.0).

4.6. Fases de derivação, validação e replicação do algoritmo farmacogenético de varfarina

Da coorte 1 (n=832), 309 casos estavam em fase estável do tratamento com varfarina (segundo critério estabelecido acima) e apresentaram um banco de dados completo (sem dados faltantes).

Para a derivação do algoritmo farmacogenético de dosagem de varfarina, 75% (Banco 1, n=232) provenientes da coorte de pacientes em dose estável (1ª coorte, n=309) foram selecionados randomicamente, deixando 25% dessa coorte para validação interna (Banco 2, n=77). Permutações randômicas para gerar os Bancos 1 e 2 foram realizadas 15.000 vezes, para avaliar a estabilidade da acurácia preditiva do modelo, independentemente do tamanho da base de dados fornecida para predição (ver seção de Resultados para mais detalhes). O modelo final de predição de dose foi baseado no modelo de regressão linear múltipla, combinando os efeitos médios de cada covariável durante as 15.000 permutações para os Bancos 1 e 2. Uma coorte adicional de pacientes em terapia estável de varfarina (2ª coorte, n=133), recrutada em um período distinto, foi utilizada para avaliar a reprodutibilidade do modelo final do algoritmo. O desenho do estudo está elucidado na **Figura 4**.

Figura 4. Desenho do estudo: fases de derivação, validação e replicação do algoritmo farmacogenético de dosagem de varfarina. Os parâmetros R^2_d e R^2_v são os coeficientes de determinação médios dos modelos de regressão linear múltipla derivados das amostras de derivação e validação interna (Banco 1 e Banco 2), respectivamente. β 's são os coeficientes de regressão correspondentes à cada covariável; ρ é o coeficiente de correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. Características gerais das coortes estudadas

A **Tabela 2** sumariza as características demográficas, clínicas e genéticas dos pacientes do estudo. Na 1ª coorte (n=832), a idade média ($\pm$ SD) foi de 63 ± 14 anos, 50,1% (417) eram mulheres, o peso médio ($\pm$ SD) foi de 72 ± 16 kg, a altura média ($\pm$ SD) foi de $1,64 \pm 0,10$ m, a maioria dos pacientes (69,9%) declarou sua raça/cor como branca, 5,8% eram fumantes, 21,3% eram diabéticos, 6,3% utilizavam aspirina (AAS) e/ou outro antiagregante plaquetário e 13,3% utilizavam amiodarona, fármaco antiarrítmico que apresenta interação medicamentosa com a varfarina. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando as coortes em dose estável foram comparadas, com exceção de uma maior frequência de autodeclarados negros (17,8 *versus* 7,1%) e menor tempo de uso de varfarina ($5,6 \pm 4,6$ *versus* $6,7 \pm 5,3$) na 2ª coorte.

As distribuições genotípicas para o polimorfismo *VKORC1* c.-1639G>A e as frequências dos metabolizadores preditos pelo *CYP2C9* das coortes são mostradas na **Tabela 2**. Observamos uma baixa incidência de indivíduos com fenótipo metabolizador lento (ML) predito pelo *CYP2C9*: 1,9% e 1,6% na 1ª e 2ª coortes em dose estável, respectivamente.

Tabela 2. Características gerais, clínicas e demográficas dos pacientes (1ª coorte – total n=832; em dose estável n=309; e 2ª coorte – n=133).

Variáveis	1ª coorte n=832	1ª coorte em dose estável n=309	2ª coorte em dose estável n=133	P
Gênero, feminino (%)	50,1	49,8	43,6	0,215
Idade (anos)	63 ± 14	64 ± 14	63 ± 17	0,939
IMC (kg/m²)	27 ± 5	27 ± 5	26 ± 4	0,169
Altura (m)	1,64 ± 0,10	1,65 ± 0,11	1,65 ± 0,09	0,717
Peso (kg)	72 ± 16	73 ± 17	71 ± 14	0,093
Raça/cor autodeclarada (%)				
Branca	69,9	75,4	58,2	< 0,001
Parda	21,6	17,5	24,0	
Negra	8,5	7,1	17,8	
Fumantes (%)	5,8	4,6	3,0	0,603
Diabéticos (%)	21,3	20,2	20,3	0,999
Uso de amiodarona (%)	13,3	10,7	10,7	1,000
Uso de AAS e/ou outros antiagregantes plaquetários (%)	6,3	2,9	6,0	0,175
Tempo de uso de varfarina	6,1 ± 5,1	6,7 ± 5,3	5,6 ± 4,6	0,030
Dose de varfarina (mg/semana)	28,6 ± 13,0	28,5 ± 11,0	27,7 ± 13,3	0,564
Fenótipos metabolizadores <i>CYP2C9</i> (%)				
ME	73,4	72,2	74,6	0,905
MI	25,2	25,9	23,8	
ML	1,4	1,9	1,6	
<i>VKORC1</i> c.-1639G>A (%)				
GG	47,3	49,5	34,4	0,060
GA	40,4	41,1	57,6	
AA	12,3	9,4	8,0	
MAF (Alelo A) (%)	33,0	30,0	37,0	
<i>ABCB1</i> c.3435C>T (%)				
CC	36,9	31,7	27,8	0,406
CT	45,5	49,5	48,9	
TT	17,6	18,8	23,3	
MAF (Alelo T) (%)	40,3	44,0	48,0	
<i>CYP4F2</i> c.1297G>A (%)				
GG	49,9	50,5	55,7	0,294
GA	41,6	40,8	39,8	
AA	8,5	8,7	4,5	
MAF (Alelo A) (%)	29,3	29,0	24,0	

Variáveis contínuas foram expressas como média ± SD. Variáveis categóricas foram expressas como frequências, em porcentagens. Polimorfismos: *CYP2C9**2 (c.430C>T, rs1799853), *CYP2C9**3 (c.1075A>C, rs1057910), *VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231), *ABCB1* c.3435C>T (rs1045642), *CYP4F2* c.1297G>A (rs2108622). ME: Metabolizador Extensivo (*1/*1); MI: Metabolizador Intermediário (*1/*2 ou *1/*3); ML: Metabolizador Lento (*2/*2, *3/*3, ou *2/*3); IMC: Índice de Massa Corporal; AAS: aspirina; MAF: Frequência do Alelo Menor. * Valores P < 0,05 revelam diferenças estatisticamente significativas entre as duas coortes em dose estável, de acordo com os testes qui-quadrado, exato de Fisher ou t de Student. As duas coortes em dose estável foram diferentes em relação à raça/cor autodeclarada e ao tempo de uso de varfarina.

Em relação ao *ABCB1* c.3435C>T, as frequências do alelo variante T (frequência do menor alelo, MAF) e do genótipo homozigoto polimórfico (TT) foram, em média, 44,2% e 20,5%, respectivamente. Para o *CYP4F2* c.1297G>A, as frequências do alelo variante A e do genótipo AA foram, em média, 26,7% e 6,5%, respectivamente. Verificamos que ambos os polimorfismos estudados no *ABCB1* e no *CYP4F2* estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambas as coortes (*ABCB1*: $p(\chi^2) = 0,103$ e $0,813$; *CYP4F2*: $p(\chi^2) = 0,926$ e $0,362$, respectivamente para a 1ª e 2ª coortes).

A dose semanal de manutenção de varfarina (em mg) foi $28,5 \pm 11,0$ para a primeira coorte em dose estável (amostra de derivação; n=309) e $27,7 \pm 13,3$ para a segunda coorte (amostra de validação externa; n=133).

5.2. Características dos pacientes da 1ª coorte em dose estável de acordo com os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2*

Verificamos as características gerais e clínicas dos pacientes da 1ª coorte em dose estável (n=309) de acordo com os subgrupos de genótipos *ABCB1* c.3435C>T (**Tabela 3a**) e *CYP4F2* c.1297G>A (**Tabela 3b**). Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos genotípicos, com exceção das porcentagens de brancos, pardos e negros em relação aos genótipos *CYP4F2* c.1297G>A, de forma que nenhum paciente autodeclarado negro apresentou genótipo homozigoto polimórfico (AA).

Tabela 3. Características gerais, clínicas e genéticas dos pacientes da 1ª coorte em dose estável (n=309) de acordo com os genótipos **a) *ABCB1* c.3435C>T** e **b) *CYP4F2* c.1297C>T**, respectivamente.

Variáveis	a) Genótipos <i>ABCB1</i> c.3435C>T			P
	CC (n=98)	CT (n=153)	TT (n=58)	
Gênero, feminino % (n)	44,9 (44)	52,3 (80)	51,7 (30)	0,495
Idade (anos)	63 ± 15	64 ± 11	64 ± 14	0,816
IMC (kg/m²)	26 ± 5	27 ± 5	27 ± 4	0,134
Raça/cor autodeclarada % (n)				
Branca	75,5 (74)	75,2 (115)	75,9 (44)	1,000
Parda	17,4 (17)	17,6 (27)	17,2 (10)	
Negra	7,1 (7)	7,2 (11)	6,9 (4)	
Fumantes % (n)	7,1 (7)	3,9 (6)	1,7 (1)	0,329
Uso de amiodarona % (n)	14,3 (14)	9,2 (14)	8,6 (5)	0,406
<i>VKORC1</i> c.-1639G>A % (n)				
GG	53,1 (52)	46,4 (71)	51,7 (30)	0,645
GA	39,8 (39)	41,8 (64)	41,4 (24)	
AA	7,1 (7)	11,8 (18)	6,9 (4)	
Fenótipos metabolizadores <i>CYP2C9</i> % (n)				
ME	70,4 (69)	72,5 (111)	74,1 (43)	0,872
MI + ML	29,6 (29)	27,5 (42)	25,9 (15)	
Variáveis	b) Genótipos <i>CYP4F2</i> c.1297G>A			P
	GG (n=156)	GA (n=126)	AA (n=27)	
Gênero, feminino % (n)	47,4 (74)	53,2 (67)	48,1 (13)	0,653
Idade (anos)	64 ± 13	63 ± 15	64 ± 14	0,902
IMC (kg/m²)	27 ± 5	27 ± 4	27 ± 4	0,997
Raça/cor autodeclarada % (n)				
Branca	69,9 (109)	78,6 (99)	92,6 (25)	0,040
Parda	19,2 (30)	17,5 (22)	7,4 (2)	
Negra	10,9 (17)	4,0 (5)	0,0 (0)	
Fumantes % (n)	5,3 (8)	4,8 (6)	3,7 (1)	0,769
Uso de amiodarona % (n)	12,2 (19)	10,3 (13)	3,7 (1)	0,469
<i>VKORC1</i> c.-1639G>A % (n)				
GG	46,2 (72)	55,6 (70)	40,7 (11)	0,235
GA	44,9 (70)	36,5 (46)	40,7 (11)	
AA	9,0 (14)	7,9 (10)	18,5 (5)	
Fenótipos metabolizadores <i>CYP2C9</i> % (n)				
ME	73,1 (114)	70,6 (89)	74,1 (20)	0,878
MI + ML	26,9 (42)	29,4 (37)	25,9 (7)	

Variáveis contínuas foram expressas como média ± SD. Variáveis categóricas foram expressas como frequências, em porcentagens. Valor P dos testes qui-quadrado, exato de Fisher ou ANOVA, comparando os subgrupos genotípicos do *ABCB1* e *CYP4F2*.

A **Tabela 4** resume as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de interesse nos genes *ABCB1* e *CYP4F2* dos pacientes da 1ª coorte em dose estável (n=309) e de acordo com os subgrupos raciais autodeclarados, categorizados como brancos (n=76) e não-brancos (n=233).

Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de interesse nos genes *ABCB1* e *CYP4F2* dos pacientes da 1ª coorte em dose estável de varfarina (n=309), de acordo com subgrupos raciais autodeclarados (não-brancos e brancos).

Polimorfismos	Não-brancos % (n) (n=76)	Brancos % (n) (n=233)	P (χ^2)
<i>ABCB1</i> c.3435C>T			
CC	31,6 (24)	31,8 (74)	0,995
CT	50,0 (38)	49,4 (115)	
TT	18,4 (14)	18,8 (44)	
MAF (alelo T)	43	44	
P (EHW)	0,878	0,954	
<i>CYP4F2</i> c.1297G>A			
GG	61,8 (47)	46,8 (109)	0,031
GA	35,5 (27)	42,5 (99)	
AA	2,7 (2)	10,7 (25)	
MAF (alelo A)	20	32	
P (EHW)	0,412	0,722	

P (EHW): valor P do teste qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)
P (χ^2): valor P dos testes qui-quadrado ou exato de Fisher, comparando as frequências genótípicas dos subgrupos não-brancos e brancos.

Para os pacientes da 1ª coorte em dose estável (n=309), as frequências do alelo variante T e do genótipo homozigoto polimórfico TT para *ABCB1* c.3435C>T foram 44% e 18,8%, respectivamente. As frequências do alelo variante A e do genótipo homozigoto polimórfico AA para *CYP4F2* c.1297G>A foram 29% e 8,7%, respectivamente (**Tabela 2**). Nossas frequências observadas são similares às frequências relatadas na literatura^{105,106,111,112}. Os polimorfismos analisados no *ABCB1* e *CYP4F2* foram encontrados em

equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) também nos subgrupos raciais autodeclarados ($p>0,05$). Foi verificada diferença estatisticamente significativa da frequência do alelo polimórfico (A) do *CYP4F2* c.1297G>A entre os subgrupos raciais (não-brancos: 20% e brancos: 32%; $p=0,031$). Porém essa diferença não foi verificada em relação ao MAF (alelo T) para o *ABCB1* c.3435C>T (não-brancos: 43% e brancos: 44%; $p=0,995$).

5.3. Avaliação da associação dos polimorfismos em *ABCB1* e *CYP4F2* com a variabilidade de dose terapêutica de varfarina

5.3.1 Dose estável de varfarina *versus* genótipos *ABCB1* c.3435C>T

A **Figura 5** mostra a distribuição da dose estável de varfarina, de acordo com os genótipos *ABCB1*, após ajuste único por RLM, considerando como covariáveis o polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T, idade, gênero, IMC, raça/cor autodeclarada, uso de amiodarona, fenótipos metabolizadores *CYP2C9* e genótipos *VKORC1* c.-1639G>A. O grupo total de pacientes com dose estável provenientes da 1ª coorte ($n=309$) foi separado em dois subgrupos: brancos ($n=233$) e não-brancos ($n=76$). Para as análises de regressão dos subgrupos raciais autodeclarados, a variável raça/cor autodeclarada não foi incluída como covariável do modelo de regressão.

Através de uma análise de variância univariada (*one-way* ANOVA) para o grupo total de pacientes em terapia anticoagulante estável da 1ª coorte ($n=309$), encontramos que as doses médias de varfarina variam de acordo com os genótipos *ABCB1* c.3435C>T: CC: $30,5 \pm 0,6$ ($n=98$), CT: $28,0 \pm 0,5$ ($n=153$), TT: $26,2 \pm 0,6$ ($n=58$) (média da dose estável $\pm$ EP em mg/semana); p (ANOVA) $< 0,001$. O método *post-hoc* de Tukey HSD revelou que os

pacientes com genótipo *ABCB1* 3435CC apresentam uma dose estatisticamente significativa mais elevada em relação aos carreadores dos genótipos CT e TT (CC *versus* TT: $p < 0.001$; CC *versus* CT: $p = 0.003$; CT *versus* TT: $p = 0.111$). Além disso, o polimorfismo *ABCB1* contribuiu significativamente para o ajuste do modelo de RLM ($p = 0,003$) (**Figura 5**).

Figura 5. Dose média de varfarina (em mg/semana) de acordo com genótipos *ABCB1* c.3435C>T em pacientes em tratamento anticoagulante estável (1ª coorte). O valor p apresentado se refere ao teste ANOVA. Valores com diferentes símbolos sobrescritos (*, #) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *post hoc* HSD de Tukey, onde: * CC é diferente de CT e TT; # CT e TT são iguais, porém diferentes de CC.

Para o subgrupo de pacientes não-brancos, também encontramos diferença estatisticamente significativa entre as doses médias estáveis de varfarina de acordo com os genótipos *ABCB1*: CC = $35,3 \pm 1,3$ (n=24), CT = $29,8 \pm 1,0$ (n=38); TT = $25,1 \pm 2,0$ (n=14) (média da dose estável $\pm$ EP em mg/semana); p (ANOVA) $< 0,001$. Os pacientes carreadores

do genótipo selvagem CC para *ABCB1* c.3435C>T apresentaram doses estatisticamente mais elevadas em relação aos carreadores dos genótipos CT e TT, de acordo com o teste *post-hoc* de Tukey (CC *versus* TT: $p<0,001$; CC *versus* CT: $p=0,006$; CT *versus* TT: $p=0,063$). Novamente, o polimorfismo *ABCB1* contribuiu significativamente para o ajuste do modelo de RLM para o subgrupo não-brancos ($p=0,006$) (**Figura 5**). Na **Tabela 5** são sumarizadas as doses preditas pelos modelos de regressão ajustados utilizando os genótipos *ABCB1* como covariável adicional.

Tabela 5. Doses de varfarina preditas pelos modelos de regressão linear ajustados utilizando os genótipos *ABCB1* como covariáveis.

Subgrupos	Genótipos <i>ABCB1</i> c.3435C>T	Média da dose predita (mg/semana)	EP	Intervalo de confiança (95%)		P (ANOVA)
Total estáveis (n=309)	CC	30,5	0,6	29,3	31,7	<0,001
	CT	28,0	0,5	27,1	29,0	
	TT	26,2	0,6	25,0	27,5	
Não- brancos (n=76)	CC	35,3	1,3	32,6	38,0	<0,001
	CT	29,8	1,0	27,7	31,9	
	TT	25,1	2,0	20,8	29,3	
Brancos (n=233)	CC	30,0	0,7	27,5	30,4	0,084
	CT	27,3	0,6	26,1	28,5	
	TT	26,8	0,7	25,4	28,1	

No entanto, para o subgrupo de pacientes brancos, não encontramos diferenças estatisticamente significativas da dose média de varfarina de acordo com os genótipos *ABCB1*: CC=30,0 $\pm$ 0,7 (n=74), CT=27,3 $\pm$ 0,6 (n=115), TT=26,8 $\pm$ 0,7 (n=44) (média da dose estável $\pm$ EP em mg/semana); p (ANOVA)=0.084; (**Figure 5**); de acordo com o teste *post-hoc* de Tukey: CC *versus* TT: $p=0,126$; CC *versus* CT: $p=0,144$; CT *versus* TT: $p=0,867$.

5.3.2 Dose estável de varfarina *versus* genótipos *CYP4F2* c.1297G>A

A **Figura 6** mostra a distribuição da dose estável de varfarina, de acordo com os genótipos *CYP4F2*, após ajuste único por RLM, considerando como covariáveis o polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A, idade, gênero, IMC, raça/cor autodeclarada, uso de amiodarona, fenótipos metabolizadores *CYP2C9* e genótipos *VKORC1* c.-1639G>A. Similarmente, para as análises de regressão dos subgrupos raciais autodeclarados, a variável raça/cor autodeclarada não foi incluída como covariável do modelo de regressão.

Figura 6. Dose média de varfarina (em mg/semana) de acordo com genótipos *CYP4F2* c.1297G>A em pacientes com tratamento anticoagulante estável (1ª coorte). O valor p apresentado se refere ao teste ANOVA. Valores com diferentes símbolos sobrescritos (*, #) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *post hoc* HSD de Tukey, onde: * CC é diferente de CT e TT; # CT e TT são iguais, porém diferentes de CC.

Em relação ao polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A, não encontramos diferenças estatisticamente significativas da dose estável média de varfarina em relação aos grupos genotípicos: GG=27,7 ± 0,4 (n=156), GA=29,3 ± 0,5 (n=126), AA=28,9 ± 0,9 (n=27); p (ANOVA) = 0,062; Teste de Tukey: GG *versus* AA: p=0,567; GG *versus* GA: p=0,053; GA *versus* AA: p=0,946. Na **Tabela 6** estão resumidas as doses preditas pelos modelos de regressão ajustados utilizando os genótipos *CYP4F2* como covariável.

Tabela 6. Doses de varfarina preditas pelos modelos de regressão linear ajustados utilizando os genótipos *CYP4F2* como covariáveis.

Subgrupos	Genótipos <i>CYP4F2</i> c.1297G>A	Média da dose predita (mg/semana)	EP	Intervalo de confiança (95%)		P (ANOVA)
Total estáveis (n=309)	GG	27,7	0,4	26,8	28,6	0,062
	GA	29,3	0,5	28,2	30,3	
	AA	28,9	0,9	27,0	30,8	
Não- brancos (n=76)	GG	29,2	1,1	27,1	31,3	0,048
	GA	33,1	1,0	31,0	35,2	
	AA	33,0	1,9	8,4	57,5	
Branco (n=233)	GG	27,1	0,6	25,9	28,2	0,257
	GA	28,3	0,6	27,1	29,5	
	AA	28,5	1,1	26,2	30,9	

Quando os subgrupos raciais autodeclarados foram avaliados, encontramos uma sutil diferença entre a dose dos indivíduos GA e GG dos pacientes não-brancos: GG=29,2 ± 1,1 (n=47), GA=33,1 ± 1,0 (n=27), AA=33,0 ± 1,9 (n=2); p (ANOVA)=0,048. De acordo com o teste *post-hoc* de Tukey: GG *versus* AA: p=0,705; GG *versus* GA: p=0,042; GA *versus* AA: p=1,000 (**Figura 6**). No entanto, apenas dois pacientes autodeclarados como não-brancos eram portadores do genótipo homozigoto polimórfico 1297AA. Além disso, para nenhum

dos modelos de RLM ajustados, a covariável *CYP4F2* c.1297G>A contribuiu significativamente (Total estáveis: $p=0,298$; Não-brancos: $p=0,612$; Brancos: $p=0,215$).

5.4. Incorporação dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido previamente

Na **Tabela 7** são mostrados os parâmetros dos modelos de RLM para estimação de dose de varfarina com e sem os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2*, desenvolvidos a partir do método elucidado na **seção 4.7 (Figura 4)**. Em resumo, a inclusão dos polimorfismos *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A foi capaz de aumentar o coeficiente de determinação (R^2) do algoritmo de 38,6% para 41,2%, explicando um adicional de 2,6% da variabilidade de dose terapêutica de varfarina. Em conjunto, as variantes em *ABCB1* e *CYP4F2* foram capazes de reduzir a soma quadrática do erro (SQE) de predição do modelo em 3,6%, uma estimativa baseada na soma dos coeficientes de determinação parciais de 1,8% apresentada por cada variante. Ainda, o modelo incluindo os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* foi capaz de prever doses mais próximas às verdadeiras (doses observadas) (erro médio relativo da dosagem (EMRD) = -0,03 mg/semana), quando comparado ao modelo sem essas variantes (EMRD = +0,08 mg/semana), como mostrado na **Tabela 7**. O EMRD é a razão entre a diferença das doses preditas e observadas médias pela dose predita média: $(DP - DO)/DP$.

Tabela 7. Coeficientes β médios, significância (valor P) e coeficiente parcial de determinação (R^2 parcial) de cada covariável dos algoritmos farmacogenéticos de dosagem de varfarina com e sem os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* (amostra de derivação, n=309).

Covariável	Modelo sem genótipos <i>CYP4F2</i> e <i>ABCB1</i>			Modelo com genótipos <i>CYP4F2</i> e <i>ABCB1</i>		
	Coeficientes β	P	R^2 parcial (%)	Coeficientes β	P	R^2 parcial (%)
Intercepto	+ 24,55	0,017		+ 22,47	0,025	
Raça/cor autodeclarada	+ 0,41	0,632	-1,8	+ 0,77	0,378	- 4,2
Uso de amiodarona	- 7,37	< 0,001	6,3	- 7,31	< 0,001	6,2
Gênero	- 1,70	0,158	0,6	- 1,92	0,109	0,8
Idade	- 1,59	< 0,001	5,5	- 1,53	< 0,001	5,3
Peso	+ 0,16	< 0,001	5,1	+ 0,16	< 0,001	5,4
Altura	+ 0,07	0,329	0,3	+ 0,08	0,277	0,4
Uso de indutores enzimáticos	+ 22,37	< 0,001	3,7	+ 21,75	< 0,001	3,7
<i>CYP2C9</i> (ME ou MI+ML)	- 2,96	0,009	2,2	- 3,11	0,006	2,5
<i>VKORC1</i> c.-1639G>A	- 7,00	< 0,001	21,0	- 7,00	< 0,001	21,6
<i>CYP4F2</i> c.1297G>A				+ 1,85	0,018	1,8
<i>ABCB1</i> c.3435C>T				- 1,68	0,019	1,8
Coeficiente de determinação total (R^2) (%)	38,6			41,2		
DP	31,1			27,7		
EMRD	+0,08			-0,03		

A dose semanal estável de varfarina (mg) foi utilizada como variável dependente dos modelos de RLM. Realizamos 15.000 permutações. As covariáveis apresentando valor p em negrito foram estatisticamente significantes para o ajuste do modelo (<0,05). As covariáveis foram categorizadas como: idade (décadas); gênero (1, se masculino, caso contrário 0); peso (kg); altura (cm); raça/cor autodeclarada (branca, parda, negra – 1, 2 e 3, respectivamente); uso de amiodarona (1, se o paciente faz uso de amiodarona, caso contrário 0); uso de indutores enzimáticos (1, se o paciente faz uso de indutores enzimáticos, caso contrário 0); fenótipos metabolizadores preditos pelos polimorfismos *CYP2C9**2 e *3 (ME ou MI + ML – 1 e 2, respectivamente); genótipos *VKORC1* c.-1639G>A (GG, GA ou AA – 0, 1 e 2, respectivamente); genótipos *CYP4F2* c.1297G>A (GG, GA ou AA – 0, 1 e 2, respectivamente); genótipos *ABCB1* c.3435C>T (CC, CT ou TT – 0, 1 e 2, respectivamente). EMRD: erro médio relativo da dosagem, calculada como (DP -DO)/DP, onde DP: média da dose predita e DO: média da dose observada. (DO = 28,5 mg/semana).

Os coeficientes de regressão (β) dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* foram -1,68 e +1,85, respectivamente. O coeficiente negativo ajustado para o *ABCB1* indica que indivíduos que apresentam alelos polimórficos em heterozigose ou homozigose (3435CT ou 3435TT), requerem doses mais baixas em comparação aos indivíduos selvagens (3435CC). Por outro lado, o coeficiente de regressão positivo do *CYP4F2* sugere que os indivíduos carreadores dos genótipos polimórficos c.1297G>A nesse gene (GA ou AA) requerem doses superiores aos indivíduos com genótipo selvagem (GG). Esses dados corroboram os encontrados na **seção 5.3**, onde avaliamos a associação dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* e a variabilidade de dose de varfarina em maiores detalhes.

Em ambos os modelos, a variante *VKORC1* c.1639G>A foi a covariável que mais contribuiu para a predição de dose (R^2 parcial = 21,6% e 21,0%, respectivamente para os modelos com e sem *ABCB1* e *CYP4F2*). Além disso, em ambos os algoritmos, raça/cor autodeclara, gênero e altura foram covariáveis que não contribuíram significativamente para o modelo ($p>0,05$).

As distribuições dos R^2 , geradas a partir das 15.000 análises randomizadas na amostra de derivação ($n=309$), dos modelos com e sem os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* estão representadas na **Figura 7**. A simetria das distribuições revela que o R^2 se comportou como uma distribuição normal, garantindo a estabilidade preditiva dos modelos.

a) com genótipos *ABCB1* e *CYP4F2*

b) sem genótipos *ABCB1* e *CYP4F2*

Figura 7. Histograma (à esquerda) e *boxplot* (à direita) mostram a distribuição normalizada dos coeficientes de determinação (R^2) dos algoritmos **a)** com e **b)** sem os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* (amostra de derivação, $n=309$).

A **Figura 8** evidencia que o modelo que inclui as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* apresenta um coeficiente de correlação de Pearson entre as DP e DO ($\rho=61,4\%$) ligeiramente maior do que o do modelo sem essas variantes ($\rho=59,7\%$). Adicionalmente, as linhas de regressão DP-DO indicam um baixo ângulo de inclinação, de forma que pacientes que

demandam baixas doses semanais de varfarina apresentam doses mais baixas do que as preditas, enquanto que pacientes que necessitam de doses elevadas apresentam doses mais altas do que as preditas. O ponto de virada da curva ocorre em 28,6 mg/semana.

Figura 8. Comparação dos coeficientes de correlação de Pearson (ρ) entre a dose observada de varfarina (DO) e a dose predita (DP) pelos algoritmos **a)** com ($\rho=0,614$) e **b)** sem ($\rho=0,597$) os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* (amostra de derivação, $n=309$).

Além disso, na **Figura 9a** os *boxplots* mostram as distribuições das doses preditas pelo algoritmo que inclui as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* (média=27,7; mediana=27,3 em mg/semana) e das doses observadas (média=28,5; mediana=27,5 em mg/semana) na coorte de derivação ($n=309$). A **Figura 9b** apresenta o erro relativo da predição (ERP), calculado como $(DP-DO)/DP$, mais uma vez sugerindo que nosso modelo de algoritmo possui uma

tendência de subestimar doses para pacientes que requerem altas doses e superestimar doses para pacientes que demandam baixas doses (dose crítica em 28,6 mg/semana).

Figura 9. Comparação entre a dose predita (DP) e dose observada (DO) **a)** *boxplot*; **b)** *scatterplot* do erro relativo de predição, $ERP = (DP - DO)/DP$, do modelo com as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* versus DO (amostra de derivação, n=309).

5.5. Fase de replicação do algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina incluindo os genótipos *ABCB1* e *CYP4F2*

A **Figura 10** mostra a correlação DP-DO de Pearson para as amostras de replicação (n=133). Para essa coorte, nosso algoritmo não apresentou uma melhora significativa da correlação DP-DO, quando comparado ao modelo que não inclui os polimorfismos *ABCB1* e *CYP4F2* (60,78% versus 60,75%, respectivamente) ⁷⁰.

Figura 10. Replicação do algoritmo (amostra de replicação, n=133). Correlação de Pearson entre a dose predita (DP) e dose observada (DO): **a)** modelo do presente estudo; **b)** Santos; **c)** IWPC; **d)** Perini; **e)** Botton com polimorfismos *CYP4F2*, *F2* e haplótipos *VKORC1* e **f)** Botton (reduzido).

Apesar disso, ambos os modelos apresentaram uma maior correlação DP-DO quando comparados aos algoritmos IWPC, de Perini e de Botton ($\rho=53,3\%$, $40,6\%$, $33,1\%$ e $32,0\%$, respectivamente) ^{36,71,113}.

A **Figura 11** confirma o comportamento do algoritmo, visto previamente na **Figura 9**, para a amostra de replicação ($n=133$). Os *boxplots* mostram a distribuição das doses preditas pelo modelo (média=26,9; mediana=27,3 em mg/semana) e doses observadas de varfarina (média=27,7; mediana=25,0 em mg/semana).

Figura 11. Comparação entre a dose predita (DP) e dose observada (DO) **a)** *boxplot*; **b)** *scatterplot* do erro relativo da predição, $ERP = (DP - DO)/DP$, do modelo com as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* versus DO (amostra de replicação, $n=133$).

5.6. Utilização de metodologia não-paramétrica para ajustar o algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina

Para essa análise, visamos explorar outro tipo de modelagem estatística, que não o modelo RLM, que melhor se ajustasse à distribuição apresentada pela variável resposta, a dose estável observada.

A **Figura 12** evidencia que a distribuição da dose estável do grupo de replicação ($n=133$) apresenta um sutil desvio de uma distribuição normal, ou seja, é não-simétrica ($p<0.001$ segundo os testes de normalidade de Komolgorov-Smirnov e Shapiro-Wilk). Dessa forma, uma metodologia de regressão não-paramétrica poderia ser mais indicada para modelar o algoritmo de predição de dose.

Figura 12. Distribuição da dose de varfarina observada para o grupo de replicação ($n=133$)
a) histograma; **b)** gráfico Q-Q.

Dentre as diversas distribuições assimétricas exploradas para modelar a variável resposta (*skew-t* tipos 1, 2, 3, 4, 5, gama, gama generalizada, *t*-generalizada, gaussiana exponencial, *t*-exponencial normal), a que melhor se ajustou à distribuição real da dose foi a *skew-t* tipo 4 (ST4), segundo parâmetro de correlação (**Figura 13**).

Figura 13. Comparação entre a distribuição da dose semanal observada (2ª coorte, $n=133$) e diversas distribuições da família GAMLSS: **a)** gama; **b)** gama generalizada; **c)** *t*-generalizada; **d)** gaussiana exponencial; **e)** *t*-exponencial normal; **f)** *skew-t* tipo 4. A distribuição *skew-t* tipo 4 (ST4) é a que apresentou melhor ajuste.

Observamos que devido à distribuição da dose ter apresentado uma assimetria (*skewness*, em inglês), desviada para a direita, as distribuições do tipo *skew-t* (ST), foram as que melhor se ajustaram à distribuição observada para a dose. Tal função faz parte do pacote de Modelos Aditivos Generalizados (GAMLSS, *Generalized Additive Models*, do inglês), disponível no software R ¹¹⁴⁻¹¹⁸.

A distribuição dos resíduos gerados a partir do ajuste do algoritmo a partir da distribuição ST4 é mostrada na **Figura 14**, evidenciando um bom ajuste do modelo (resíduos: média=0,01; DP=1,0; variância=1,0).

Figura 14. Resíduos gerados a partir do ajuste do modelo utilizando a distribuição ST4 a) histograma b) gráfico Q-Q.

Para o modelo do algoritmo gerado a partir da distribuição ST4, obtivemos uma dose média predita de 25,2 mg/semana. Os coeficientes e significâncias para cada covariável estão mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Coeficientes médios e significância (valor P) de cada covariável do algoritmo farmacogenético de dosagem de varfarina ajustado a partir da distribuição *skew-t* tipo 4 (ST4) (2ª coorte, n=133).

Covariável	Modelo com genótipos <i>CYP4F2</i> e <i>ABCB1</i>	
	Coeficientes	P
Intercepto	+ 17,58	0,301
Raça/cor autodeclarada	+ 1,13	0,246
Uso de amiodarona	- 8,14	< 0,001
Gênero	+ 1,35	0,497
Idade	- 0,11	0,024
Peso	+ 0,05	0,416
Altura	+ 0,12	0,296
<i>CYP2C9</i> (ME ou MI+ML)	- 6,13	< 0,001
<i>VKORC1</i> c.-1639G>A	- 5,94	< 0,001
<i>CYP4F2</i> c.1297G>A	+ 1,53	0,203
<i>ABCB1</i> c.3435C>T	+ 1,22	0,205
DP (mg/semana)	25,191	

A partir da comparação das doses preditas pelo algoritmo modelado pela distribuição ST4 com as doses preditas pelo algoritmo gerado a partir do modelo de RLM e a dose real observada, encontramos que o modelo ST4 prediz, em geral, doses mais baixas do que o modelo RLM (DP do modelo ST4: mín=8,4; máx=37,3; média=25,2; mediana=26,0 em mg/semana; DP do modelo RLM: mín=3,7; máx=42,9; média=28; mediana=29,6 em mg/semana) (**Figura 15a**). Além disso, a partir do gráfico da diferença dos erros quadráticos das dosagens preditas pelo modelo ST4 e RLM (**Figura 15b**), verificamos que, comparativamente, para doses menores que 30,5 mg/semana o modelo ST4 apresentou

menores erros quadráticos de predição, enquanto que para doses maiores que 30,5 mg/semana o modelo RLM se superou na predição em relação ao modelo ST4.

Figura 15. a) Comparação entre as doses preditas (DP) pelos modelos ST4 e RLM e a dose observada (DO) **b)** Diferença entre os erros quadráticos das dosagens preditas pelos modelos ST4 e RLM (n=133).

Assim, apesar de o modelo ST4 ter se ajustado melhor à distribuição de dose observada, para doses superiores a 30,5 mg/semana essa abordagem estatística utilizada para modelar a dose predita de varfarina não foi melhor do que a anteriormente utilizada (RLM), que não levou em consideração a assimetria da distribuição.

6. DISCUSSÕES

6.1. Avaliação da associação dos polimorfismos em *ABCB1* e *CYP4F2* com a variabilidade de dose terapêutica de varfarina

No presente estudo, observamos que os pacientes carreadores do alelo variante c.3435T no gene *ABCB1* (genótipos CT e TT) necessitaram, em média, de dosagens estáveis de varfarina inferiores quando comparadas aos indivíduos selvagens CC, quando a dose foi ajustada a partir de outros fatores genéticos, clínicos e demográficos relevantes. Resultados similares foram obtidos no estudo de Wadelius *et al.* (2004). Neste estudo, os autores verificaram que um haplótipo do *ABCB1* que incluía apenas o alelo 3435T variante, sendo os genótipos dos outros SNPs selvagens, foi encontrado em maior porcentagem ($p(\chi^2) = 0,0242$) no subgrupo de pacientes que requerem doses mais baixas de varfarina (<0.33 mg/kg, 60%), em comparação aos subgrupos que requerem uma dose média (0.33-0.46 mg/kg, 25%) ou alta (>0.46 mg/kg, 15%). Ainda, foi observado que os pacientes carreadores desse haplótipo, heterozigotos para a variante 3435T (n=20), necessitaram de uma dose de varfarina 24% mais baixa, em média, em relação aos pacientes que não apresentam esse haplótipo (n=180) ⁷⁹.

De maneira similar, Kim Y e colaboradores (2013) verificaram que os pacientes carreadores do genótipo homozigoto polimórfico *ABCB1* c.3435TT necessitaram, descritivamente, da menor dose média de varfarina quando comparada às doses médias de manutenção dos pacientes com genótipos CT ou CC (dose de varfarina (mg/semana): CC

(n=70): 59,5; CT (n=90): 56,9; TT (n=36): 55,6). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos genotípicos. Apesar disso, de acordo com a raça, é possível verificar que os africanos, hispânicos e americanos-asiáticos (o subgrupo de não-brancos no estudo de Kim Y *et al.*), quando analisados conjuntamente apresentaram uma tendência de diminuição de dose de varfarina à medida que o genótipo tem adição do alelo variante 3435T⁹⁴. Os autores consideraram que o estudo apresentou baixo poder estatístico devido a um número reduzido de pacientes em alguns subgrupos genotípicos. Similarmente, outros estudos também falharam em encontrar uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T e requerimentos de dose de varfarina^{92,103}.

Contrário aos nossos resultados, no estudo brasileiro de De Oliveira Almeida *et al.* (2011) foi observado que o alelo variante *ABCB1* c.3435T contribuiu para doses superiores de varfarina em pacientes trombofílicos^{93,119}. Esse achado foi observado exclusivamente para o subgrupo de pacientes que necessitam de dose semanal de varfarina superior a 70 mg (classificados com pacientes resistentes à varfarina). É válido pontuar que no estudo de De Oliveira Almeida e colaboradores a frequência observada para o alelo variante T foi muito elevada (66%) em comparação à frequência reportada em outros estudos brasileiros, incluindo o presente (em torno de 40%)^{105,106}. Além disso, em seu estudo os pacientes foram categorizados em dois subgrupos: aqueles recebendo doses semanais de varfarina superiores a 70 mg (resistentes) e aqueles recebendo doses inferiores, o que difere da metodologia de análise do presente estudo.

Na literatura, os estudos que objetivaram investigar os efeitos do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T na glicoproteína-P (gp-P) são bastante controversos ^{97,98,107}. Em alguns estudos, foi observado aumento do efluxo do substrato em análise, bem como aumento de expressão do mRNA da gp-P no trato intestinal de carreadores do genótipo selvagem 3435CC em comparação aos indivíduos 3435CT ou 3435TT ^{120,121}. Contrariamente, outros estudos relataram que esses mesmos parâmetros foram significativamente menores nos indivíduos selvagens ¹²²⁻¹²⁴. Em outras palavras, alguns estudos reportaram que o polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T leva ao aumento da função ou expressão da gp-P, embora outros tenham encontrado que essa variante causa perda de função da gp-P, podendo levar à uma atividade reduzida ^{107,120,125-127}. Contudo, esses estudos não foram realizados com o mesmo substrato e mesmas populações. Assim, é possível que o efeito do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T sobre a atividade da gp-P dependa do substrato analisado, em específico, bem como de fatores ambientais ^{98,128}.

As hipóteses biológicas sobre como a variante *ABCB1* c.3435C>T afeta a gp-P são diversas. O *ABCB1* c.3435C>T consiste em uma mutação silenciosa, uma vez que essa substituição de nucleotídeo não leva à alteração do aminoácido codificado pelo códon (isoleucina, posição 1145), portanto não altera a estrutura primária da gp-P codificada. Apesar disso, Chava *et al.* (2007) pressupõe, com base em resultados observados, que a variante rs1045642 leva à uma alteração conformacional da gp-P, podendo afetar os sítios de reconhecimento a alguns substratos e explicando as alterações observadas do perfil funcional dessa proteína. Os autores assumem que essa mudança conformacional poderia ocorrer devido à variante c.3435C>T alterar o tempo de enovelamento proteico co-traducional, em consequência da tradução de um códon raro ¹²⁶. Outra hipótese considera que outras variantes

em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo c.3435C>T, presentes em regiões de controle de expressão gênica do *ABCB1* (por exemplo, regiões promotoras ou *enhancers*), são responsáveis por influenciar a expressão da proteína gp-P^{120,129}. Adicionalmente, é sabido que a variante *ABCB1* c.3435C>T está em forte desequilíbrio de ligação com as variantes não-sinônima c.2677T>G (p.Ser893Ala) e sinônima c.1236T>C (p.Gly412=), de forma que alguns autores acreditam que a variante c.3435C>T por si só não influencia a atividade da gp-P, mas sim o haplótipo como um todo^{99,100}.

Em relação ao impacto do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T no requerimento de dose de varfarina, sugerimos que a possível explicação biológica dos nossos achados consiste no fato do alelo variante 3435T (ou SNP em forte desequilíbrio de ligação) levarem à uma atividade reduzida de efluxo desse substrato, seja por alteração de expressão ou, menos provavelmente, devido à alteração do enovelamento da gp-P, gerando uma diferença sutil em sua estrutura terciária e afetando o sítio de reconhecimento da varfarina. Em ambos os casos, haveria aumento da biodisponibilidade da varfarina e, portanto, menores doses seriam requeridas pelos pacientes que apresentam os genótipos 3435CT e 3435TT.

No entanto, nosso estudo apresenta uma importante limitação: nós não analisamos a ancestralidade genética dos pacientes. Ao invés disso, nós utilizamos o parâmetro raça/cor autodeclarada, categorizada de acordo com os critérios do censo brasileiro IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Esse parâmetro, apesar de ser muito útil no cenário de estudos de vida-real, não se correlaciona completamente com a ancestralidade genética nos indivíduos da população brasileira¹³⁰, uma vez que a autopercepção de cor/raça no Brasil é

considerada primariamente com base em características fenotípicas do indivíduo, bem como fatores sociais, culturais e geográficos ¹³¹.

A associação entre o *ABCB1* c.3435C>T e os requerimentos de dose de varfarina, o principal achado do nosso estudo, foi observada para o grupo total de pacientes em terapia anticoagulante estável, bem como para o subgrupo de pacientes autodeclarados não-brancos, mas não para o subgrupo de autodeclarados brancos. Na literatura, há evidências de que o efeito de variantes genéticas sobre a variabilidade de dose de varfarina pode diferir de acordo com a raça ¹³². Assim, a limitação em nosso estudo citada acima poderia estar, pelo menos parcialmente, contribuindo para essa falta de associação. Além disso, o alelo variante c.3435T no gene *ABCB1* é menos comum em pardos e negros do que na população caucasiana, segundo dados publicados da população geral brasileira, com base em análises de ancestralidade ¹⁰⁵. Apesar desse fato, foi observado no estudo de Kim *et al.* (2001) que a função e atividade da gp-P são equivalentes em americanos-europeus e afro-americanos ¹²⁵. Dessa forma, são necessários estudos suplementares para elucidar o impacto específico do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T em subgrupos raciais de pacientes brasileiros.

Com relação à falta de associação do polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A com o requerimento de dose de varfarina, verificamos que apesar de as doses em cada subgrupo genotípico não serem estatisticamente diferentes, mesmo quando os subgrupos raciais autodeclarados foram avaliados, houve uma tendência descritiva de aumento de dose semanal (mg/semana) em indivíduos carreadores do alelo polimórfico 1297A (correspondendo aos genótipos GA e AA): GG=27,7 ± 0,4 (n=156), GA=29,3 ± 0,5 (n=126), AA=28,9 ± 0,9 (n=27).

Contrário aos nossos resultados que não evidenciaram significância estatística, através de um estudo de associação genômica ampla (GWAS), Caldwell e colaboradores (2008) encontraram evidências de que o polimorfismo rs2108622 influencia marginalmente na variabilidade de dose de varfarina. Os autores verificaram em três casuísticas independentes de pacientes caucasianos em terapia anticoagulante estável (n=1009), que a variante *CYP4F2* c.1297G>A contribuiu com aproximadamente 1 mg por dia (ou 7 mg/semana) de aumento da dosagem em indivíduos homozigotos polimórficos AA, em comparação com indivíduos com genótipo selvagem GG ⁷⁶. Outros estudos reportaram resultados similares ^{111,112,133}.

Em resumo, nossos resultados parciais sugerem que o polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T pode influenciar o requerimento de dose de varfarina em pacientes brasileiros, quando associado a outros fatores genotípicos, demográficos e clínicos relevantes.

6.2. Incorporação dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido previamente

De acordo com meta-análises recentes, modelos que incluem variantes genéticas para guiar o tratamento com a varfarina são considerados efetivos em melhorar a segurança e efetividade da terapia anticoagulante, através da diminuição da ocorrência de eventos adversos (hemorrágicos e tromboembólicos), maior tempo dentro da faixa terapêutica recomendada e diminuição do tempo para se atingir uma terapia anticoagulante estável, quando comparado ao modo tradicional de estabelecimento de dose de varfarina ^{61-65,69}. As principais variantes genéticas que explicam a variabilidade de resposta/dose de varfarina

estão localizadas nos genes *VKORC1* e *CYP2C9* e são bem caracterizadas e descritas na literatura ^{11,12}. No entanto, uma porcentagem considerável (mais de 40%) dessa variabilidade continua inexplicada.

No presente estudo, verificamos que a incorporação dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* no algoritmo farmacogenético estimador de dose de varfarina desenvolvido previamente ⁷⁰, que já incluía como preditores as variantes genéticas no *VKORC1* e *CYP2C9*, bem como idade, uso de co-medicações (em especial amiodarona e indutores enzimáticos), peso, altura, gênero e raça/cor autodeclarada, foi capaz de acurar a predição de dose de varfarina, explicando um adicional de 3,6% da variabilidade de dose e aumentando marginalmente o coeficiente de determinação total do algoritmo e a correlação entre a dose predita e observada. Além disso, o algoritmo que inclui as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* foi capaz de prever doses mais próximas às verdadeiras, quando comparado ao modelo que não inclui essas variantes genéticas, apresentando menor erro médio relativo de dosagem.

Após validar nosso algoritmo em uma segunda coorte independente de pacientes em terapia anticoagulante estável, o modelo que incorpora as variantes *ABCB1* e *CYP4F2* apresentou uma correlação DP-DO similar ao apresentado pelo modelo sem essas variantes, não demonstrando desempenho superior na predição de dose de varfarina. No entanto, ambos os algoritmos desenvolvidos pelo nosso grupo (presente e anterior) ao serem testados nessa coorte de pacientes brasileiros demonstraram melhor desempenho quando comparados a outros algoritmos, apresentando a maior correlação DP-OD ^{36,71,113}. Até mesmo o modelo de Botton que inclui a mesma variante *CYP4F2* c.1297G>A avaliada por nós, apresentou um

desempenho inferior, indicando que nossos algoritmos podem ser mais acurados na predição de dose de varfarina em pacientes brasileiros, que são altamente miscigenados.

De fato, o algoritmo desenvolvido pelo Consórcio Internacional da Farmacogenética da Varfarina (IWPC) incluiu em sua coorte de derivação pacientes de nove diferentes países dos quatro continentes, não sendo calibrado para uma população específica. No mesmo sentido, os algoritmos de Botton foram desenvolvidos a partir de dados demográficos e genéticos de pacientes da região sul do Brasil, que, de maneira geral, possuem um alto grau de ascendência europeia não sendo tão miscigenados quanto o restante da população brasileira. Uma análise prospectiva em 318 pacientes revelou que as doses preditas pelo algoritmo de Santos *et al.* (2015) foram mais próximas às esperadas quando comparado ao algoritmo IWPC, especialmente em pacientes com TTR $\geq 73\%$ e com dose estável ($p < 0,001$), sugerindo que quando aplicado à população brasileira o algoritmo desenvolvido pelo nosso grupo é mais acurado do que o IWPC ⁷⁰. No presente estudo, entretanto, não fomos capazes de realizar uma análise prospectiva para validar esse resultado no algoritmo incluindo as variantes *ABCB1* e *CYP4F2*.

No algoritmo desenvolvido no presente estudo, a variante *VKORC1* c.-1639G>A foi a que explicou de maneira mais robusta a variabilidade de varfarina, apresentando um coeficiente parcial de determinação de 21,6%, resultado que está de acordo com a literatura atual ^{12,34,36,39,40,51,75,134}. Apesar disso, os fenótipos metabólicos preditos pelas variantes *CYP2C9**2 e *3 não foram tão robustos como preditores (R^2 parcial = 2,5%) em comparação ao reportado em outros estudos para outras coortes ^{34,75,134-136}. As covariáveis idade, peso e uso de co-medicações (amiodarona e indutores enzimáticos, especificamente) foram as

variáveis não-genéticas que mais contribuíram como preditoras do requerimento de dose de varfarina (apresentando alta significância para o ajuste do modelo: $p < 0,001$), o que é também suportado por outros estudos ^{134,137-143}.

A contribuição do polimorfismo *CYP4F2* c.1297G>A para o algoritmo avaliado nesse estudo (R^2 parcial = 1,8%) foi inferior ao descrito no estudo italiano de Borgiani *et al.* ⁷⁵, que reportou um coeficiente de determinação parcial para essa variante de 6.3%, e ao descrito por Wei *et al.* ⁵⁹ para pacientes chineses-han (R^2 parcial = 4,8%). Por outro lado, nossos resultados para o *CYP4F2* estão em concordância com o verificado por Caldwell *et al.* ⁷⁶, que reportou que a variante rs2108622 explicou um adicional de 2% da variabilidade de dose de varfarina em coorte de pacientes americanos caucasianos, e de Pautas *et al.* ⁸³, que verificou um R^2 parcial de 1,1% em pacientes idosos franceses caucasianos.

Em um estudo com pacientes brasileiros, Perini *et al.* ¹³³ verificaram um R^2 parcial de 1.1% para a variante *CYP4F2* e uma associação positiva com a dose (coeficiente de regressão (β) por genótipo: GA= +0,06; AA= +0,42), de modo similar aos nossos resultados. Além disso, a inclusão dos genótipos *CYP4F2* como covariável do algoritmo desenvolvido por esses autores (juntamente com os preditores idade, peso, indicação de tratamento com varfarina, co-medicação com amiodarona ou sinvastatina e genótipos *VKORC1* e *CYP2C9*) foi capaz de aumentar marginalmente o coeficiente de correlação PD-OD (de 55 para 56%), assim como visto no presente estudo. Adicionalmente, no estudo de Botton *et al.* ⁷¹ que também incluiu paciente brasileiros (porém do sul do Brasil), os autores verificaram que os genótipos *CYP4F2* 1297GA e 1297AA contribuíram de maneira estatisticamente significativa para o ajuste do modelo estimador de dose desenvolvido por eles (GA: $p=0,006$,

AA: $p=0,01$). Os autores reportaram ainda que o polimorfismo no *CYP4F2*, juntamente com uma variante no gene *F2* e um haplótipo do *VKORC1*, foram capazes de aumentar a acurácia de predição do modelo em 6,1% (de 59,5 para 65,6%), porém a contribuição apenas do *CYP4F2* não foi citada.

Evidências sugerem que o polimorfismo não-sinônimo *CYP4F2* c.1297G>A, o qual ocasiona em uma troca do aminoácido valina por metionina na posição 433 da proteína codificada (p.Val433Met), interfere nos requerimentos de dose de varfarina devido a essa variante genética levar à redução dos níveis da proteína *CYP4F2*, metabolizadora da vitamina K. Consequentemente, há um aumento da biodisponibilidade da vitamina K, de forma que carreadores do alelo variante *CYP4F2* 1297A necessitem de maiores doses de varfarina do que pacientes com genótipo selvagem ⁸⁸. Portanto, há plausibilidade biológica para considerar essa variante genética como um biomarcador válido para o requerimento de varfarina de um indivíduo.

Pelo o que sabemos, existe apenas um estudo publicado na literatura vigente que, assim como no presente estudo, visou avaliar a contribuição do polimorfismo *ABCB1* c.3435C>T como covariável de um modelo estimador de dose de varfarina, o estudo de Isaac e colaboradores ¹⁰³. Nesse estudo, os autores reportaram que a inclusão dessa variante na equação de regressão para predizer a dose semanal de varfarina explicou um adicional de 3,8% da variabilidade de dose em pacientes egípcios, juntamente com as covariáveis idade e genótipos *VKORC1* c.-1639G>A. Além disso, no estudo de Isaac *et al.* a correlação DP-DO aumentou em 4% (de 41,4 para 45,7%), quando os genótipos *ABCB1* foram incorporados ao

modelo, resultados consideravelmente maiores do que os obtidos no presente estudo para uma coorte de pacientes brasileiros (R^2 parcial = 1,8%).

Como discutido anteriormente, o impacto fisiológico do polimorfismo silencioso *ABCB1* c.3435C>T é conflitante na literatura. Alguns estudos sugerem que o rs1045642 leva à um aumento da expressão à nível transcricional (mRNA) e atividade da gp-P^{120,121}, o que levaria a um decréscimo da biodisponibilidade do substrato e, em consequência, maiores doses de varfarina seriam requeridas pelos carreadores do alelo variante 3435T^{93,103}. No entanto, outros dados sugerem que essa variante pode causar uma mudança conformacional na gp-P, devido a presença de um códon raro, afetando a especificidade ao substrato e, como resultado, diminuindo a atividade da gp-P¹²⁶. Uma menor funcionalidade da gp-P pode resultar em maior absorção intestinal e maior biodisponibilidade da varfarina, o que pode explicar a associação negativa entre a variante 3435C>T e o requerimento de dose de varfarina observada através do coeficiente de regressão (β) negativo.

6.3. Limitações

Como uma importante limitação do nosso algoritmo, verificamos que esse apresenta uma tendência de subestimar doses para pacientes que requerem mais do que 28,6 mg/semana (aproximadamente a dose média observada na coorte de 309 pacientes com dose estável) e superestimar doses para pacientes que necessitam de doses inferiores a esse valor. Dessa forma, pacientes que apresentam genótipos associados à predisposição de doses reduzidas de varfarina, podem requerer doses ainda menores do que as preditas por esse algoritmo, podendo-se advir uma superdosagem, de modo a elevar drasticamente o risco de eventos

hemorrágicos. O oposto também pode ocorrer para os pacientes que requerem altas doses, de forma que pacientes que apresentam genótipos associados à predisposição de doses maiores de varfarina podem requerer doses ainda maiores do que as preditas. Na meta-análise de Saffian e colaboradores, a tendência em subestimar doses para pacientes que requerem altas doses de varfarina também foi verificada em outros algoritmos, como os desenvolvidos por IWPC, Gage, Perini e Botton ¹⁴⁴. Os autores dessa meta-análise consideram que essa limitação comum pode estar relacionada ao fato de que as covariáveis mais robustas normalmente inseridas nos algoritmos estão associadas à redução de dose de varfarina (exemplos: variantes nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *ABCB1*, uso de amiodarona) e pouco explicam a predisposição de aumento de dose (variante no gene *CYP4F2*, uso de indutores enzimáticos, peso, raça). Dessa forma, é necessário aprimorar ainda mais os modelos estimadores de dose de varfarina, para capturar a relação dose-reposta tanto em pacientes que requerem baixas quanto em pacientes que requerem altas doses ¹⁴⁵.

Outras limitações do presente estudo são: 1) esse foi desenvolvido a partir de dados de pacientes adultos, não podendo ser extrapolado para crianças; 2) a faixa terapêutica de RNI considerada foi entre 1,8 a 3,2, não podendo ser utilizado como base para pacientes que possuem outra faixa terapêutica recomendada; 3) os pacientes foram recrutados em um único centro, porém as coortes de derivação e replicação foram selecionadas em dois períodos distintos; 4) não foi possível incluir dados da dieta dos pacientes (em especial ingestão de vitamina K), bem como dados quantitativos da prática de exercícios físicos e fumo (apenas considerado com uma variável dicotômica sim/não).

6.4. Considerações finais

Como perspectivas futuras, consideramos que após replicação de resultados e acúmulo de evidências que indiquem real associação entre as variantes genéticas e a variabilidade de requerimento de dose de varfarina, análises de custo-efetividade para avaliar os benefícios de se incluir tais variáveis a algoritmos estimadores de dose de varfarina são necessárias e deveriam ser consideradas. Particularmente, consideramos que a inclusão de variantes genéticas adicionais em um ensaio de genotipagem não aumentaria drasticamente os custos e complexidade experimental, se, por exemplo, fosse adotada uma abordagem otimizada baseada na genotipagem multi-SNP através de *arrays*, que possibilitaria a genotipagem de múltiplos SNP por indivíduo por ensaio ^{69,86,146,147}. Já os benefícios clínicos (efetividade) que novas variantes genéticas podem trazer para a terapia anticoagulante, como diminuição de eventos adversos, encurtamento do período para se atingir uma terapia estável e aumento do TTR, devem ser avaliados em estudos prospectivos randomizados, ainda escassos na literatura.

Apesar de atualmente existirem mais opções de anticoagulantes orais (os DOACs), e a transição para o uso desses anticoagulantes diretos estar ocorrendo intensamente em países desenvolvidos, a varfarina continua sendo a primeira opção de fármaco anticoagulante oral nos países emergentes devido ao seu baixo custo e fácil acessibilidade ¹⁴⁸⁻¹⁵². Especificamente no Brasil, em uma reunião realizada em 2016 pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia no SUS, levando em consideração aspectos como eficácia, acurácia, efetividade e segurança da tecnologia, além da avaliação econômica comparativa dos benefícios e dos custos em relação às tecnologias já existentes, foi decidida a não

incorporação dos medicamentos apixabana, rivaroxabana e dabigatrana para prevenção de acidente vascular cerebral em pacientes com fibrilação atrial crônica não valvar, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) ¹⁵³. Além de seus maiores custos, destacaram-se as desvantagens dos DOACs: não indicação de uso em pacientes com insuficiência renal grave (*clearance* de creatinina < 30 mL/min) e em pacientes com prótese valvar mecânica (devido os DOACs serem majoritariamente excretados pelos rins e pacientes com válvulas prostéticas possuírem um risco aumentado para AVC ^{154,155}), bem como a impossibilidade de controlar seu efeito por testes laboratoriais e a ausência de antídoto. Assim, é improvável que nos próximos anos a varfarina seja substituída pelos DOACs de maneira significativa em países em desenvolvimento, de forma que a abordagem de algoritmos farmacogenéticos é ainda apropriada como uma opção para melhorar a terapia anticoagulante.

Ainda, apesar de a maioria dos atuais algoritmos farmacogenéticos estimadores de dose de varfarina serem capazes de explicar entre 30 e 60% da variabilidade de dose de varfarina, dependendo da população, quando comparados aos algoritmos clínicos ou abordagem tradicional utilizada para estabelecimento de dosagem o método guiado pela farmacogenética é capaz de oferecer doses estimadas mais acuradas, apresentando um valor clínico importante ^{36,69,156,157}.

7. CONCLUSÕES

Verificamos que ambos os polimorfismos *ABCB1* c.3435C>T e *CYP4F2* c.1297G>A contribuíram para a predição de dose de varfarina em pacientes brasileiros, quando associados a outros fatores genotípicos, demográficos e clínicos relevantes, sendo estatisticamente significativos, aumentando o coeficiente de determinação do algoritmo e explicando um adicional da variabilidade interindividual de dosagem.

Ainda, nossos resultados sugerem que carreadores da variante *ABCB1* c.3435C>T requerem doses médias de manutenção de varfarina inferiores quando comparados aos indivíduos da população brasileira com genótipo selvagem, além de termos observado uma grande variabilidade de dose de varfarina no subgrupo de pacientes autodeclarados não-brancos dessa população, de acordo com os genótipos *ABCB1*.

Apesar de a modelagem alternativa do algoritmo, através da função *skew-t* tipo 4, levar em consideração a distribuição assimétrica da dose apresentada pelo grupo de replicação (2ª coorte), essa abordagem não foi capaz de acurar a predição de dosagem para pacientes que requerem altas doses de varfarina, quando comparado ao modelo obtido através do método de regressão linear múltipla, não se mostrando vantajoso.

Assim, nosso estudo demonstra que a contribuição dos genótipos *ABCB1* e *CYP4F2* em explicar a variabilidade total dos requerimentos de varfarina é estatisticamente significativa e pode ser relevante para acurar a terapêutica com varfarina na população brasileira quando adotados em algoritmos farmacogenético. Para avaliar a contribuição na

prática clínica desses dados farmacogenéticos, estudos prospectivos randomizados que comparam algoritmos tradicionais e genéticos de dosagem de varfarina são necessários.

8. ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FMUSP)

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.079.839

InCor

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não há riscos pois serão utilizadas amostras já coletadas.

Benefícios: Não há benefícios diretos ao participante de pesquisa. Auxiliará na avaliação da influência dos polimorfismos na dose de varfarina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado e exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente incluídos na Plataforma Brasil.

Recomendações:

Recomenda-se pela aprovação do projeto bem como pela dispensa do TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_892852.pdf	02/05/2017 16:50:05		Aceito
Outros	CADASTRO_ON_LINE_4519_17_019.pdf	02/05/2017 16:49:01	MARINEUZA GOMES RANGEL	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_4519_17_019.pdf	02/05/2017 16:48:29	MARINEUZA GOMES RANGEL	Aceito
Outros	ParecerParte_I_Leticia_Tavares.pdf	26/04/2017 16:44:02	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Outros	Carta_de_Projeto.pdf	26/04/2017 16:43:00	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	26/04/2017 16:16:43	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Outros	Anexo_II.pdf	26/04/2017 16:16:16	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Outros	Analise_Orcamentaria_SDC_4519_17_019.pdf	26/04/2017 16:15:23	Alexandre da Costa Pereira	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.079.839

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CAPPesq_0804_10.pdf	26/04/2017 16:13:48	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Leticia_Tavares.pdf	26/04/2017 16:03:49	Alexandre da Costa Pereira	Aceito
Orçamento	Orcamento_Leticia_Tavares.pdf	26/04/2017 16:03:05	Alexandre da Costa Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Maio de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO B – Artigo de coautoria: “Pharmaceutical care increases time in therapeutic range of patients with poor quality of anticoagulation with warfarin”

Pharmaceutical Care Increases Time in Therapeutic Range of Patients With Poor Quality of Anticoagulation With Warfarin

Leiliane Rodrigues Marcatto¹, Luciana Sacilotto², Letícia Camargo Tavares¹, Mirella Facin², Natália Olivetti², Celia Maria Cassaro Strunz³, Francisco Carlos Costa Darrieux², Maurício Ibrahim Scanavacca², Jose Eduardo Krieger¹, Alexandre Costa Pereira¹ and Paulo Caleb Junior Lima Santos^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Bimal Malhotra,
Pfizer, United States

Reviewed by:
Nazareno Paolocci,
Johns Hopkins University,
United States
Milica S. Prostran,
University of Belgrade, Serbia

***Correspondence:**
Paulo Caleb Junior Lima Santos
paulo.caleb@unifesp.br;
pcaleb@usp.br

Specialty section:
This article was submitted to
Cardiovascular and Smooth Muscle
Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 04 June 2018
Accepted: 31 August 2018
Published: 21 September 2018

Citation:
Marcatto LR, Sacilotto L, Tavares LC,
Facin M, Olivetti N, Strunz CMC,
Darrieux FCC, Scanavacca MI,
Krieger JE, Pereira AC and
Santos PCJL (2018) Pharmaceutical
Care Increases Time in Therapeutic
Range of Patients With Poor Quality
of Anticoagulation With Warfarin.
Front. Pharmacol. 9:1052.
doi: 10.3389/fphar.2018.01052

¹ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Faculdade de Medicina FMUSP, Heart Institute (InCor), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ² Arrhythmia Unit, Faculdade de Medicina FMUSP, Heart Institute (InCor), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³ Clinical Laboratory, Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina FMUSP, Heart Institute (InCor), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴ Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

Thromboembolic events are associated with high mortality and morbidity indexes. In this context, warfarin is the most widely prescribed oral anticoagulant agent for preventing and treating these events. This medication has a narrow therapeutic range and, consequently, patients usually have difficulty in achieving and maintaining stable target therapeutics. Some studies on the literature about oral anticoagulant management showed that pharmacists could improve the efficiency of anticoagulant therapy. However, the majority of these studies included general patients retrospectively. The aim of this study was to prospectively evaluate a pharmacist's warfarin management in patients with poor quality of anticoagulation therapy (Time in the Therapeutic Range-TTR < 50%). We included 268 patients with atrial fibrillation (AF) and without stable dose of warfarin (TTR < 50%, based on the last three values of International Normalized Ratio-INR). We followed them up for 12 weeks, INR values were evaluated and, when necessary, the dose adjustments were performed. During the first four visits, patient's INR was measured every 7 days. Then, if INR was within the target therapeutic range (INR: 2–3), the patient was asked to return in 30 days. However, if INR was out the therapeutic target, the patient was asked to return in 7 days. Adherence evaluation was measured through questionnaires and by counting the pills taken. Comparison between basal TTR (which was calculated based on the three last INR values before prospective phase) and TTR of 4 weeks (calculated by considering the INR tests from visits 0 to 4, in the prospective phase of the study) and basal TTR and TTR of 12 weeks (calculated based on the INR tests from visits 0 to 12, in the prospective phase of the study) revealed significant statistical differences (0.144 ± 0.010 vs. 0.382 ± 0.016 ;

9. REFERÊNCIAS

1. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde (OMS). Doenças Cardiovasculares. [on-line], 2016. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares-catid=845:noticias&Itemid=839; Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022 / Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf; Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro/ Brasil. Ministério da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/DCNT.pdf>; Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
4. IHME. Institute for Health Metrics and Evaluation – Brazil, 2017. Disponível em: <http://www.healthdata.org/brazil>; Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
5. Brant LCC, Nascimento BR, Passos VMA, et al. Variations and particularities in cardiovascular disease mortality in Brazil and Brazilian states in 1990 and 2015: estimates from the Global Burden of Disease. *Rev Bras Epidemiol* 2017; **20Suppl 01**(Suppl 01): 116-28.
6. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schünemann HJ, Panel ACoCPATaPoT. 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.
7. Lee MT, Klein TE. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities. *J Hum Genet* 2013; **58**(6): 334-8.
8. Barnes GD, Lucas E, Alexander GC, Goldberger ZD. National Trends in Ambulatory Oral Anticoagulant Use. *Am J Med* 2015; **128**(12): 1300-5 e2.
9. van Gorp RH, Schurgers LJ. New Insights into the Pros and Cons of the Clinical Use of Vitamin K Antagonists (VKAs) Versus Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Nutrients*; **7**(11): 9538-57.

10. Tavares LC, Marcatto LR, Santos PC. Genotype-guided warfarin therapy: current status. *Pharmacogenomics* 2018; **19**(7): 667-85.
11. Dean L. Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1. In: Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, Dean L, Malheiro A, editors *Medical Genetics Summaries [Internet] Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US);* 2012.
12. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther* 2017; **102**(3): 397-404.
13. Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; **126**(3 Suppl): 204S-33S.
14. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J* 2006; **6**(1): 16-21.
15. El-Helou N, Al-Hajje A, Ajrouche R, et al. Adverse drug events associated with vitamin K antagonists: factors of therapeutic imbalance. *Vasc Health Risk Manag* 2013; **9**: 81-8.
16. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2007; **115**(21): 2689-96.
17. Keeling D, Baglin T, Tait C, et al. Guidelines on oral anticoagulation with warfarin - fourth edition. *Br J Haematol* 2011; **154**(3): 311-24.
18. 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): 569-74.
19. Esmerio FG, Souza EN, Leiria TL, Lunelli R, Moraes MA. Constant use of oral anticoagulants: implications in the control of their adequate levels. *Arq Bras Cardiol* 2009; **93**(5): 549-54.
20. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, et al. 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-e84S.
21. 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-98S.

22. Ebell MH. Evidence-based adjustment of warfarin (Coumadin) doses. *Am Fam Physician* 2005; **71**(10): 1979-82.
23. Wigle P, Hein B, Bloomfield HE, Tubb M, Doherty M. Updated guidelines on outpatient anticoagulation. *Am Fam Physician*; **87**(8): 556-66.
24. Vestergaard AS, Skjoth F, Larsen TB, Ehlers LH. The importance of mean time in therapeutic range for complication rates in warfarin therapy of patients with atrial fibrillation: A systematic review and meta-regression analysis. *PLoS One*; **12**(11): e0188482.
25. Schmitt L, Speckman J, Ansell J. Quality assessment of anticoagulation dose management: comparative evaluation of measures of time-in-therapeutic range. *J Thromb Thrombolysis* 2003; **15**(3): 213-6.
26. Dallalzadeh LO, Go AS, Chang Y, Borowsky LH, Fang MC, Singer DE. Stability of High-Quality Warfarin Anticoagulation in a Community-Based Atrial Fibrillation Cohort: The Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *J Am Heart Assoc* 2016; **5**(7).
27. Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY. Novel oral anticoagulants. *Int J Clin Pract* 2009; **63**(4): 630-41.
28. Scanavacca M, Darrieux F. Factors in Deciding between Novel and Traditional Oral Anticoagulants to Prevent Embolism in Atrial Fibrillation Patients. *Arq Bras Cardiol* 2016; **106**(1): 1-3.
29. Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag* 2015; **11**: 967-77.
30. 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): 519-31.
31. Trujillo T, Dobesh PP. Clinical use of rivaroxaban: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing regimens in different indications. *Drugs* 2014; **74**(14): 1587-603.
32. Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet* 2008; **47**(9): 565-94.
33. 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.
34. Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**(3): 326-31.

35. 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): 1083-91.
36. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009; **360**(8): 753-64.
37. Sinxadi P, Blockman M. Warfarin resistance. *Cardiovasc J Afr* 2008; **19**(4): 215-7.
38. Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadee W. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood* 2008; **112**(4): 1013-21.
39. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; **14**(13): 1745-51.
40. Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* 2010; **115**(18): 3827-34.
41. Owen RP, Gong L, Sagreiya H, Klein TE, Altman RB. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics*; **20**(10): 642-4.
42. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; **352**(22): 2285-93.
43. Geisen C, Watzka M, Sittlinger K, et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005; **94**(4): 773-9.
44. Ross KA, Bigham AW, Edwards M, Gozdzik A, Suarez-Kurtz G, Parra EJ. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *J Hum Genet*; **55**(9): 582-9.
45. 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): 957-63.
46. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; **358**(10): 999-1008.
47. Tomek A, Maťoška V, Kolářová T, et al. The bleeding risk during warfarin therapy is associated with the number of variant alleles of CYP2C9 and VKORC1 genes. *Cardiology* 2013; **125**(3): 182-91.

48. Shaw K, Amstutz U, Hildebrand C, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes are predictors of warfarin-related outcomes in children. *Pediatr Blood Cancer* 2014; **61**(6): 1055-62.
49. Biss TT, Avery PJ, Williams MD, Brandao LR, Grainger JD, Kamali F. The VKORC1 and CYP2C9 genotypes are associated with over-anticoagulation during initiation of warfarin therapy in children. *J Thromb Haemost* 2013; **11**(2): 373-5.
50. Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; **65**(4): 365-75.
51. 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* 2012; **16**(8): 957-63.
52. Pirmohamed M. Personalized pharmacogenomics: predicting efficacy and adverse drug reactions. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; **15**: 349-70.
53. Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics* 2010; **11**(6): 781-91.
54. 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): 717-9.
55. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002; **287**(13): 1690-8.
56. Sridharan K, Modi T, Bendkhale S, Kulkarni D, Gogtay NJ, Thatte UM. Association of Genetic Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 with Bleeding Following Warfarin: A Case-Control Study. *Curr Clin Pharmacol* 2016; **11**(1): 62-8.
57. NIH US National Library of Medicine. COUMADIN-Warfarin Sodium Tablet: dosage and administration. Bristol-Myers Squibb Pharma Company, Princeton, NJ, USA (2017).
58. Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *J Am Coll Cardiol* 2011; **57**(5): 612-8.
59. 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* 2012; **107**(6): 1083-91.

60. Duconge J, Ramos AS, Claudio-Campos K, et al. A Novel Admixture-Based Pharmacogenetic Approach to Refine Warfarin Dosing in Caribbean Hispanics. *PLoS One*; **11**(1): e0145480.
61. Goulding R, Dawes D, Price M, Wilkie S, Dawes M. Genotype-guided drug prescribing: a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Br J Clin Pharmacol* 2015; **80**(4): 868-77.
62. Liao Z, Feng S, Ling P, Zhang G. Meta-analysis of randomized controlled trials reveals an improved clinical outcome of using genotype plus clinical algorithm for warfarin dosing. *J Thromb Thrombolysis* 2015; **39**(2): 228-34.
63. Xu H, Xie X, Wang B, et al. Meta-analysis of efficacy and safety of genotype-guided pharmacogenetic dosing of warfarin. *Int J Cardiol* 2014; **177**(2): 654-7.
64. Li X, Yang J, Wang X, Xu Q, Zhang Y, Yin T. Clinical benefits of pharmacogenetic algorithm-based warfarin dosing: meta-analysis of randomized controlled trials. *Thromb Res* 2015; **135**(4): 621-9.
65. Dahal K, Sharma SP, Fung E, et al. Meta-analysis of Randomized Controlled Trials of Genotype-Guided vs Standard Dosing of Warfarin. *Chest* 2015; **148**(3): 701-10.
66. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, et al. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II). *Circulation*; **125**(16): 1997-2005.
67. 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*; **12**(9): 1480-7.
68. Šupe S, Poljaković Z, Božina T, Ljevak J, Macolić Šarinić V, Božina N. Clinical Application of Genotype-guided Dosing of Warfarin in Patients with Acute Stroke. *Arch Med Res* 2015; **46**(4): 265-73.
69. Gage BF, Bass AR, Lin H, et al. Effect of Genotype-Guided Warfarin Dosing on Clinical Events and Anticoagulation Control Among Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty: The GIFT Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017; **318**(12): 1115-24.
70. Santos PC, Marcatto LR, Duarte NE, et al. Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration. *Pharmacogenomics* 2015; **16**(8): 865-76.
71. 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* 2011; **72**(3): 442-50.

72. Valentin II, Vazquez J, Rivera-Miranda G, et al. Prediction of warfarin dose reductions in Puerto Rican patients, based on combinatorial CYP2C9 and VKORC1 genotypes. *Ann Pharmacother* 2012; **46**(2): 208-18.
73. Marcatto LR, Sacilotto L, Bueno CT, et al. 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* 2016; **16**(1): 224.
74. Lee AY, Levine MN, Baker RI, et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**(2): 146-53.
75. Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics* 2009; **10**(2): 261-6.
76. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 2008; **111**(8): 4106-12.
77. Cen HJ, Zeng WT, Leng XY, et al. CYP4F2 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br J Clin Pharmacol* 2010; **70**(2): 234-40.
78. Glurich I, Berg RL, Burmester JK. Does CALU SNP rs1043550 contribute variability to therapeutic warfarin dosing requirements? *Clin Med Res* 2013; **11**(2): 73-9.
79. Wadelius M, Sörlin K, Wallerman O, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics J* 2004; **4**(1): 40-8.
80. Chung JE, Lee KE, Chang BC, Gwak HS. Polymorphisms of vitamin K-related genes (EPHX1 and VKORC1L1) and stable warfarin doses. *Gene* 2018; **641**: 68-73.
81. Liu HQ, Zhang CP, Zhang CZ, Liu XC, Liu ZJ. Influence of two common polymorphisms in the EPX1 gene on warfarin maintenance dosage: a meta-analysis. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 564149.
82. Chan SL, Thalamuthu A, Goh BC, et al. Exon sequencing and association analysis of EPX1 genetic variants with maintenance warfarin dose in a multiethnic Asian population. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**(1): 35-41.
83. Pautas E, Moreau C, Gouin-Thibault I, et al. Genetic factors (VKORC1, CYP2C9, EPX1, and CYP4F2) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **87**(1): 57-64.
84. Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 2006; **95**(2): 205-11.

85. Özer M, Demirci Y, Hizel C, et al. Impact of genetic factors (CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2) on warfarin dose requirement in the Turkish population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013; **112**(3): 209-14.
86. Bader LA, Elewa H. The Impact of Genetic and Non-Genetic Factors on Warfarin Dose Prediction in MENA Region: A Systematic Review. *PLoS One* 2016; **11**(12): e0168732.
87. Paulus E, Komperda K, Park G, Fusco J. Anticoagulation Therapy Considerations in Factor VII Deficiency. *Drug Saf Case Rep* 2016; **3**(1): 8.
88. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol* 2009; **75**(6): 1337-46.
89. Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. *Mayo Clin Proc* 2009; **84**(12): 1079-94.
90. Danese E, Montagnana M, Johnson JA, et al. Impact of the CYP4F2 p.V433M polymorphism on coumarin dose requirement: systematic review and meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther*; **92**(6): 746-56.
91. Zhang J, Chen Z, Chen C. Impact of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 genetic polymorphisms on maintenance warfarin dosage in Han-Chinese patients: A systematic review and meta-analysis. *Meta Gene* 2016; **9**: 197-209.
92. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet* 2009; **5**(3): e1000433.
93. De Oliveira Almeida VC, De Souza Ferreira AC, Ribeiro DD, Gomes Borges KB, Salles Moura Fernandes AP, Brunialti Godard AL. Association of the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and therapeutic doses of warfarin in thrombophilic patients. *J Thromb Haemost* 2011; **9**(10): 2120-2.
94. Kim Y, Smith A, Wu AH. C3435T polymorphism of MDR1 gene with warfarin resistance. *Clin Chim Acta* 2013; **425**: 34-6.
95. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**(5): 860-71.
96. Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J Am Coll Cardiol* 2013; **61**(25): 2495-502.
97. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**(10): 1295-310.

98. Lepper ER, Nooter K, Verweij J, Acharya MR, Figg WD, Sparreboom A. Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics* 2005; **6**(2): 115-38.
99. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci* 2006; **95**(10): 2293-308.
100. Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganey VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *J Clin Pharm Ther* 2007; **32**(6): 641-9.
101. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **80**(5): 486-501.
102. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; **360**(4): 363-75.
103. Issac MS, El-Nahid MS, Wissa MY. Is there a role for MDR1, EPHX1 and protein Z gene variants in modulation of warfarin dosage? a study on a cohort of the Egyptian population. *Mol Diagn Ther* 2014; **18**(1): 73-83.
104. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; **11**(3): 217-21.
105. Santos PC, Soares RA, Santos DB, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet* 2011; **12**: 13.
106. Scheiner MA, Damasceno AM, Maia RC. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Mol Biol Rep* 2010; **37**(1): 111-8.
107. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 2003; **4**(4): 397-410.
108. SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 2017-2018. <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>.
109. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017; **40**(Suppl 1): S11-S24.
110. Witt DM, Clark NP, Kaatz S, Schnurr T, Ansell JE. Guidance for the practical management of warfarin therapy in the treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2016; **41**(1): 187-205.

111. Zhang JE, Jorgensen AL, Alfirevic A, et al. Effects of CYP4F2 genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2009; **19**(10): 781-9.
112. 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): 442-50.
113. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E, et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**(6): 722-8.
114. Stasinopoulos M. Distributions for Generalized Additive Models for Location Scale and Shape. 2017. Disponível em: <https://www.rdocumentation.org/packages/gamlss.dist/versions/5.0-4>; Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
115. Stasinopoulos D. M., R.A. R. Generalized additive models for location scale and shape (GAMLSS) in R.: *Journal of Statistical Software*; 2007.
116. Rigby RA, M SD. Generalized additive models for location, scale and shape (with discussion). *Appl. Statist.*; 2005. p. 507-54.
117. A. A, Capitanio A. Distributions generated by perturbation of symmetry with emphasis on a multivariate skew t-distribution. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*; 2003. p. 367-89.
118. Jones MC, Faddy MJ. A skew extension of the t distribution, with applications. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*; 2003. p. 159-74.
119. de Oliveira Almeida VC, Ribeiro DD, Gomes KB, Godard AL. Polymorphisms of CYP2C9, VKORC1, MDR1, APOE and UGT1A1 genes and the therapeutic warfarin dose in Brazilian patients with thrombosis: a prospective cohort study. *Mol Diagn Ther* 2014; **18**(6): 675-83.
120. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(7): 3473-8.
121. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; **104**(2): 147-53.
122. Morita Y, Sakaeda T, Horinouchi M, et al. MDR1 genotype-related duodenal absorption rate of digoxin in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2003; **20**(4): 552-6.
123. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, et al. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**(10): 1356-9.

124. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**(4): 297-303.
125. Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**(2): 189-99.
126. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; **315**(5811): 525-8.
127. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001; **11**(4): 293-8.
128. Perloff MD, von Moltke LL, Störmer E, Shader RI, Greenblatt DJ. Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br J Pharmacol* 2001; **134**(8): 1601-8.
129. Frittitta L, Ercolino T, Bozzali M, et al. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes* 2001; **50**(8): 1952-5.
130. 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* 2011; **6**(2): e17063.
131. Santos RV, Fry PH, Monteiro S, et al. Color, Race, and Genomic Ancestry in Brazil: Dialogues between Anthropology and Genetics. *Current Anthropology*; 2009. p. 787-819
132. Limdi NA, Brown TM, Yan Q, et al. Race influences warfarin dose changes associated with genetic factors. *Blood* 2015; **126**(4): 539-45.
133. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Suarez-Kurtz G. Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **87**(4): 417-20.
134. Santos PC, Dinardo CL, Schetttert IT, et al. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; **69**(4): 789-97.
135. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **87**(5): 572-8.

136. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; **106**(7): 2329-33.
137. Doecke CJ, Cosh DG, Gallus AS. Standardised initial warfarin treatment: evaluation of initial treatment response and maintenance dose prediction by randomised trial, and risk factors for an excessive warfarin response. *Aust N Z J Med* 1991; **21**(3): 319-24.
138. Brigden ML, Kay C, Le A, Graydon C, McLeod B. Audit of the frequency and clinical response to excessive oral anticoagulation in an out-patient population. *Am J Hematol* 1998; **59**(1): 22-7.
139. Hylek EM, Regan S, Go AS, Hughes RA, Singer DE, Skates SJ. Clinical predictors of prolonged delay in return of the international normalized ratio to within the therapeutic range after excessive anticoagulation with warfarin. *Ann Intern Med* 2001; **135**(6): 393-400.
140. Froom P, Miron E, Barak M. Oral anticoagulants in the elderly. *Br J Haematol* 2003; **120**(3): 526-8.
141. Fang MC, Go AS, Hylek EM, et al. Age and the risk of warfarin-associated hemorrhage: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation study. *J Am Geriatr Soc* 2006; **54**(8): 1231-6.
142. Clark NP, Delate T, Riggs CS, et al. Warfarin interactions with antibiotics in the ambulatory care setting. *JAMA Intern Med* 2014; **174**(3): 409-16.
143. Marcatto LR, Sacilotto L, Darrieux FC, et al. Age is associated with time in therapeutic range for warfarin therapy in patients with atrial fibrillation. *Oncotarget* 2016; **7**(34): 54194-9.
144. Saffian SM, Duffull SB, Wright D. Warfarin Dosing Algorithms Underpredict Dose Requirements in Patients Requiring ≥ 7 mg Daily: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2017; **102**(2): 297-304.
145. Sagreiya H, Sagreiya H, Berube C, et al. Extending and evaluating a warfarin dosing algorithm that includes CYP4F2 and pooled rare variants of CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* 2010; **20**(7): 407-13.
146. Cottingham K. Product Review: Multiple choices for SNPs. *Anal. Chem.*; 2004. p. 179 A–81 A.
147. You JH. Pharmacoeconomic evaluation of warfarin pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother* 2011; **12**(3): 435-41.
148. Wu AH. Pharmacogenomic-guided dosing for warfarin: too little too late? *Per Med* 2018; **15**(2): 71-3.

149. Sonuga BO, Hellenberg DA, Cupido CS, Jaeger C. Profile and anticoagulation outcomes of patients on warfarin therapy in an urban hospital in Cape Town, South Africa. *Afr J Prim Health Care Fam Med* 2016; **8**(1): e1-8.
150. Bista D, Chalmers L, Bereznicki L, Peterson G. Potential use of NOACs in developing countries: pros and cons. *Eur J Clin Pharmacol* 2014; **70**(7): 817-28.
151. Chugh SS, Roth GA, Gillum RF, Mensah GA. Global burden of atrial fibrillation in developed and developing nations. *Glob Heart* 2014; **9**(1): 113-9.
152. Massaro AR, Lip GYH. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: Focus on Latin America. *Arq Bras Cardiol* 2016; **107**(6): 576-89.
153. BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Relatório de recomendação. Apixabana, rivoraxabana e dabigatana em pacientes com fibrilação atrial não valvar. Brasília; CONITEC; N° 195, 2016. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/Relatrio_Anticoagulantes_final.pdf; Acesso em 14 de fevereiro de 2018.
154. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*; **129**(23): e521-643.
155. Di Biase L. Use of Direct Oral Anticoagulants in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Lesions. *J Am Heart Assoc* 2016; **5**(2).
156. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med* 2013; **369**(24): 2294-303.
157. Jiang NX, Ge JW, Xian YQ, Huang SY, Li YS. Clinical application of a new warfarin-dosing regimen based on the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in atrial fibrillation patients. *Biomed Rep* 2016; **4**(4): 453-8.

APÊNDICE A – Artigo: “Impact of incorporating *ABCB1* and *CYP4F2* polymorphisms in a pharmacogenetics-guided warfarin dosing algorithm for the Brazilian population”

European Journal of Clinical Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00228-018-2528-z>

PHARMACOGENETICS

Impact of incorporating *ABCB1* and *CYP4F2* polymorphisms in a pharmacogenetics-guided warfarin dosing algorithm for the Brazilian population

Letícia C. Tavares¹ · Nubia E. Duarte² · Leiliane R. Marcatto¹ · Renata A. G. Soares¹ · Jose E. Krieger¹ · Alexandre C. Pereira¹ · Paulo Caleb Junior Lima Santos^{1,3}

Received: 25 May 2018 / Accepted: 16 July 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Interpatient variation of warfarin dose requirements may be explained by genetic variations and general and clinical factors. In this scenario, diverse population-calibrated dosing algorithms, which incorporate the main warfarin dosing influencers, have been widely proposed for predicting supposed warfarin maintenance dose, in order to prevent and reduce adverse events. The aim of the present study was to evaluate the impact of the inclusion of *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A polymorphisms as additional covariates in a previously developed pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm calibrated for the Brazilian population.

Methods Two independent cohorts of patients treated with warfarin ($n = 832$ and $n = 133$) were included for derivation and replication of the algorithm, respectively. Genotyping of *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A polymorphisms was performed by polymerase chain reaction followed by melting curve analysis and TaqMan® assay, respectively. A multiple linear regression was performed for the warfarin stable doses as a dependent variable, considering clinical, general, and genetic data as covariates.

Results The inclusion of *ABCB1* and *CYP4F2* polymorphisms was able to improve the algorithm's coefficient of determination (R^2) by 2.6%. In addition, the partial determination coefficients of these variants revealed that they explained 3.6% of the warfarin dose variability. We also observed a marginal improvement of the linear correlation between observed and predicted doses (from 59.7 to 61.4%).

Conclusion Although our study indicates that the contribution of the combined *ABCB1* and *CYP4F2* genotypes in explaining the overall variability in warfarin dose is not very large, we demonstrated that these pharmacogenomic data are statistically significant. However, the clinical relevance and cost-effective impact of incorporating additional variants in warfarin dosing algorithms should be carefully evaluated.

Keywords Warfarin pharmacogenetics · Genetic-guided dosing algorithm · *ABCB1* · *MDR1* · *CYP4F2* · Warfarin stable dose

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00228-018-2528-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Paulo Caleb Junior Lima Santos
paulo.caleb@unifesp.br

- ¹ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ² Department of Mathematic and Statistics, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Caldas, Colombia
- ³ Department of Pharmacology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil

Introduction

Warfarin is the major anticoagulant prescribed for the long-term treatment and prophylaxis of patients at risk of thromboembolic events [6, 45]. However, therapy with warfarin is complex due to a wide variation of dosing requirements among patients, as this drug presents a narrow therapeutic window and its pharmacokinetics and pharmacodynamics responses are highly variable according to genetic, clinical, and demographic factors [23, 41, 47, 78]. Consequently, management of warfarin therapy requires regular monitoring of the international normalized ratio (INR) parameter. Target INR therapeutic range, which assures safe and effective

APÊNDICE B – Artigo: “Association between *ABCB1* polymorphism and stable warfarin dose requirements in Brazilian patients”

Association Between *ABCB1* Polymorphism and Stable Warfarin Dose Requirements in Brazilian Patients

Letícia C. Tavares¹, Leiliane R. Marcatto¹, Renata A. G. Soares¹, Jose E. Krieger¹, Alexandre C. Pereira¹ and Paulo C. J. L. Santos^{1,2*}

¹ Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Rick Kittles,
Irell and Manella Graduate School of
Biological Sciences, City of Hope,
United States

Reviewed by:

Jason Hansen Karnes,
University of Arizona, United States
Adam P. Bress,
University of Utah, United States

*Correspondence:

Paulo C. J. L. Santos
paulo.caleb@unifesp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacogenetics and
Pharmacogenomics,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 15 March 2018

Accepted: 04 May 2018

Published: 23 May 2018

Citation:

Tavares LC, Marcatto LR,
Soares RAG, Krieger JE, Pereira AC
and Santos PCJL (2018) Association
Between *ABCB1* Polymorphism and
Stable Warfarin Dose Requirements in
Brazilian Patients.
Front. Pharmacol. 9:542.
doi: 10.3389/fphar.2018.00542

The ideal dose of the oral anticoagulant warfarin varies widely among patients, mainly due to genetic factors. Genetic variations that impact warfarin pharmacokinetics and the vitamin K cycle are plausible candidates for being associated with warfarin dose requirements. Therefore, the aim of this study was to assess whether polymorphisms in the *ABCB1* and *CYP4F2* genes were associated with stable warfarin dose requirements in Brazilian patients. This retrospective study included samples from 309 individuals. Genotyping of *ABCB1* c.3435C>T and *CYP4F2* c.1297G>A were performed by polymerase chain reaction followed by melting curve analysis (HRM-PCR) and TaqMan[®] genotyping assay, respectively. Stable doses were adjusted in a linear multiple regression model for age, gender, body mass index, self-reported race, use of amiodarone, *CYP2C9* (*2 and *3), *VKORC1* c.1639G>A, and *ABCB1* c.3435C>T or *CYP4F2* c.1297G>A. By performing a univariate analysis of variance, we found that the warfarin patients who carry *ABCB1* c.3435T variant alleles (CT and TT genotypes) need fewer warfarin stable doses in comparison with the individuals that are CC wild-type: 2.5 ($p = 0.003$) and 4.3 ($p < 0.001$) mg/week less, respectively, for the overall group of patients on stable anticoagulation therapeutics ($n = 309$); and 5.5 ($p = 0.006$) and 10.2 ($p < 0.001$) mg/week less, respectively, for the self-declared non-white stable subgroup ($n = 76$). No statistically significant differences in dose requirements were observed according to *CYP4F2* genotypes. In conclusion, our results suggest *ABCB1* c.3435C>T variant may influence warfarin dose requirements in Brazilian patients, when associated with other genotypic, demographic and clinical factors.

Keywords: warfarin pharmacogenetics, *ABCB1*, *MDR1*, *CYP4F2*, warfarin stable dose

INTRODUCTION

In the last 65 years, warfarin has been the most widely prescribed oral anticoagulant for treating and preventing thromboembolic events (Barnes et al., 2015). However, due to its narrow therapeutic index and high variance of pharmacokinetics and pharmacodynamics, warfarin interpatient responses are largely variable. Doses of warfarin administered out of the optimal therapeutic range commonly lead to serious adverse events, such as hemorrhagic and thromboembolic events in cases of over and under dosage, respectively. In addition to demographic and clinical factors, such as age, weight and use of concurrent medication, genetics is well established to play an important role in influencing warfarin maintenance dosage among patients (Klein et al., 2009; Johnson et al., 2011).

Review

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

Pharmacogenomics

Genotype-guided warfarin therapy: current status

Letícia C Tavares^{*,†,1}, Leiliane R Marcatto^{‡,1} & Paulo CJL Santos^{*,1,2}

¹Laboratory of Genetics & Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, SP 05403-900, Brazil

²Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, SP 04044-020, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 11 55764848/Voip 1030; paulo.caleb@unifesp.br

**Author for correspondence: leticia.tavares@usp.br

‡Authors contributed equally

Warfarin pharmacogenomics has been an extensively studied field in the last decades as it is focused on personalized therapy to overcome the wide interpatient warfarin response variability and decrease the risk of side effects. In this expert review, besides briefly summarizing the current knowledge about warfarin pharmacogenetics, we also present an overview of recent studies that aimed to assess the efficacy, safety and economic issues related to genotype-based dosing algorithms used to guide warfarin therapy, including randomized and controlled clinical trials, meta-analyses and cost-effectiveness studies. To date, the findings still present disparities, mostly because of standard limitations. Thus, further studies should be encouraged to try to demonstrate the benefits of the application of warfarin pharmacogenomic dosing algorithms in clinical practice.

First draft submitted: 20 December 2017; Accepted for publication: 8 March 2018; Published online: 27 April 2018

Keywords: genotype-guided dosing algorithms • pharmacogenetic-based algorithm • pharmacogenetics • polymorphisms • vitamin K antagonist • warfarin

The vitamin K antagonists (VKAs), in particular warfarin, have been the most commonly prescribed anticoagulants for the treatment and prevention of thromboembolic events in patients with atrial fibrillation (AF), arterial and venous thrombosis, pulmonary embolism, prosthetic heart valves, among other indications [1]. VKAs act by inhibiting the recycling of the reduced form of vitamin K (vitamin K hydroquinone or KH_2), which is required as a cofactor for the activation of the clotting factors II, VII, IX, X and the anticoagulant proteins C, S and Z [2]. Warfarin is administered as a racemic mixture of the S and R enantiomers, with the S-warfarin form being three- to five-times more potent. Warfarin mechanism of action is presented in Figure 1.

Despite showing high efficacy, VKAs have a narrow therapeutic window and large interindividual variance of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, mainly due to genetics, concomitant drugs, diet and general and clinical characteristics of the patient. These factors lead to great difficulty in determining the patient's ideal warfarin dosage to achieve effective anticoagulation therapy, since an individual's required warfarin dose may vary up to tenfold between patients [3]. Therefore, the major hazard of prescribing mistaken warfarin doses lies in the fact that under or over dosing may increase risk for side effects such as thrombotic or hemorrhagic events, respectively. Thus, regular monitoring of warfarin therapy is required and it is assessed as per the International Normalized Ratio (INR) value, a parameter that quantifies the coagulation activity through the prothrombin time. Warfarin therapy is considered efficient when INR values reach the target therapeutic range, which is dependent upon the indication [4].

Another concept used to measure INR stability is the time in the therapeutic range (TTR). This parameter quantifies the mean percentage of time in which the patient was within the INR target range. However, there are different ways to perform the TTR calculation [5]. One of them, the traditional method, considers the number of visits the patient presented the INR in the target range and divides it by the number of visits with assessed INR. Another approach is the Rosendaal's method [6], which assumes that INR values change linearly over time and considers the amount of days between consecutive visits. TTR is particularly important as a measurement of

Future
Medicine

APÊNDICE D – Artigo: “Juvenile hemochromatosis: *HAMP* mutation and severe iron overload treated with phlebotomies and deferasirox”

Submit a Manuscript: <http://www.f6publishing.com>

World J Clin Cases 2017 October 16; 5(10): 381-383

DOI: 10.12998/wjcc.v5.i10.381

ISSN 2307-8960 (online)

CASE REPORT

Juvenile hemochromatosis: *HAMP* mutation and severe iron overload treated with phlebotomies and deferasirox

Manuel A Lescano, Letícia C Tavares, Paulo C J L Santos

Manuel A Lescano, Institute of Digestive Tract of Southwestern Bahia, Bahia, BA 45023-145, Brazil

Letícia C Tavares, Paulo C J L Santos, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, SP 05403-900, Brazil

Author contributions: Lescano MA, Tavares LC and Santos PCJL make substantial contributions to conception and design of the case report, acquisition, analysis, and interpretation of data; all authors participate in drafting the article and revising it critically for important intellectual content.

Institutional review board statement: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clínicas (HC), Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, Brazil (SDC: 4027/14/007).

Informed consent statement: The study participants provided informed consent prior to study enrollment.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest in this study.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Unsolicited manuscript

Correspondence to: Paulo C J L Santos, PhD, Adjunct Professor (Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), Collaborator Researcher, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, 03 de Maio, St. INFAR, 4th floor, Vila Clementino, São Paulo, SP 05403-900, Brazil. pacaleb@usp.br
Telephone: +55-11-55764848

Received: March 21, 2017

Peer-review started: March 23, 2017

First decision: June 15, 2017

Revised: June 23, 2017

Accepted: August 2, 2017

Article in press: August 3, 2017

Published online: October 16, 2017

Abstract

Juvenile hemochromatosis (JH) is a rare condition classified as an autosomal recessive disorder that leads to severe iron absorption. JH usually affects people under the age of 30 and presents symptoms such as chronic liver damage, hypogonadotropic hypogonadism, cardiac diseases and endocrine dysfunctions. The present case reports a 29-year-old Brazilian woman with JH condition due to *HAMP* mutation (g.47G>A), treated with phlebotomies and deferasirox. She presented symptoms such as weakness, skin hyperpigmentation, joint pain in the shoulders and hands and amenorrhea. First laboratory tests showed altered biochemical parameters [serum ferritin (SF): 5696 ng/mL, transferrin saturation (TS): 85%]. After sessions of phlebotomies (450 mL every 15 d), the patient presented partial symptomatic improvements and biochemical parameters (SF: 1000 ng/mL, Hb: 11 g/dL). One year later, deferasirox (15 mg/kg per day) was introduced to the treatment, and the patient showed total symptomatic improvement, with significant clearing of the skin, SF: 169 ng/mL, and TS: 50%. Furthermore, after the combined deferasirox-phlebotomy therapy, magnetic resonance imaging measurements revealed normalized level for liver iron (30 μ mol/g; reference value < 36 μ mol/g). In conclusion, combined deferasirox-phlebotomy treatment was able to normalize iron levels and improve symptoms.

Key words: Genetic disease; Juvenile hemochromatosis; *HAMP* gene; Mutation; Iron chelation

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

WJCC | www.wjgnet.com

381

October 16, 2017 | Volume 5 | Issue 10 |