

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

EMÍLIO ITAMAR DE FREITAS CAMPOS

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES CYP2C9, VKORC1,  
MDR1 E APOE E VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS NA  
DOSE DE VARFARINA EM PACIENTES ATENDIDOS EM TRÊS  
CLÍNICAS DE ANTICOAGULAÇÃO EM BELO HORIZONTE-MG

Belo Horizonte

2018

Emílio Itamar de Freitas Campos

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES CYP2C9, VKORC1,  
MDR1 E APOE E VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS NA  
DOSE DE VARFARINA EM PACIENTES ATENDIDOS EM TRÊS  
CLÍNICAS DE ANTICOAGULAÇÃO EM BELO HORIZONTE-MG

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de  
mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Parreiras Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Belo Horizonte

2018

C198i Campos, Emílio Itamar de Freitas.  
Influência de polimorfismos nos genes CYP2C9, VKORC1, MDR1 e APOE e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação em Belo Horizonte-MG [manuscrito]. / Emílio Itamar de Freitas Campos. - - Belo Horizonte: 2018.  
99f.: il.  
Orientador: Maria Auxiliadora Parreiras Martins.  
Coorientador: Karina Braga Gomes Borges.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Varfarina/administração & dosagem. 2. Polimorfismo Genético. 3. Fatores Epidemiológicos. 4. Estudos Transversais. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Martins, Maria Auxiliadora Parreiras. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título. NLM: OV 193

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E**  
**MEDICINA TROPICAL**

Reitora: **Profa. Sandra Regina Goulart Almeida**

Vice-Reitor: **Prof. Alessandro Fernandes Moreira**

Pró-Reitor de Pós-Graduação: **Prof. Fábio Alves da Silva Júnior**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Prof. Mário Fernando Montenegro Campos**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: **Profa. Alamanda Kfoury Pereira**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Sub-coordenadora do Centro de Pós-Graduação: **Profa. Eli Iola Gurgel Andrade**

Chefe do Departamento de Clínica Médica: **Profa. Valéria Maria Augusto**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

Sub-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical:

**Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

**Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos**

**Profa. Denise Utsch Gonçalves**

**Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

**Prof. Unaí Tupinambás**

**Prof. Vandack Alencar Nobre Jr**

**Thaís Teodoro de Oliveira Santos** – Representante Discente

Linha de pesquisa: **Cardiologia Tropical**

## **AGRADECIMENTOS**

Venho expressar a minha sincera gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e a conclusão desse trabalho, e que me permitiram alcançar a meta em que encontro hoje. Agradeço primeiramente a Deus.

Às minhas orientadoras, as professoras Maria Auxiliadora Parreiras Martins e Karina Braga Gomes Borges, pela confiança no meu trabalho, pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas, e pelo carinho comigo.

Agradeço ao professor Manoel Otávio da Costa Rocha por toda contribuição dada, sem a qual não teríamos conseguido finalizar esse trabalho. Ao Renan Pedra de Souza por todo tempo disponibilizado e contribuição na análise estatística.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e à secretária do programa Luciene Vieira, pela paciência, educação e prontidão ao responder meus questionamentos.

À toda equipe do Hospital das Clínicas, do Hospital Risoleta Tolentino Neves e da Unidade de Referência Secundária Sagrada Família pela contribuição essencial no recrutamento dos pacientes e, principalmente durante a coleta de sangue.

À FAPEMIG e ao CNPQ pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos meus amigos e familiares pelas palavras de apoio e de conforto nos momentos difíceis, e pelo incentivo. Agradeço à Aline de Oliveira Magalhães Mourão por todo ensinamento concedido no momento em que eu ainda era aluno de iniciação científica. E à Isadora Gonçalves Ferreira pela parceria, prontidão e auxílio essenciais.

## RESUMO

A varfarina é o anticoagulante oral mais amplamente utilizado para tratamento e prevenção de distúrbios tromboembólicos. A monitorização da terapia é realizada por meio da medida da Relação Normalizada Internacional (RNI), e o tempo na faixa terapêutica (TTR) representa uma medida da qualidade da anticoagulação oral. Na prática clínica, existe uma ampla variação na dose-resposta à varfarina que é parcialmente determinada por fatores genéticos. Há evidências de que polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* podem influenciar na dose de varfarina. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de fatores sociodemográficos, clínicos e dos polimorfismos \*1, \*2 e \*3 para o gene *CYP2C9*, -1639 G>A para o gene *VKORC1*, 3435 C>T para *MDR1* e ε2, ε3 e ε4 para *APOE* na dose de manutenção semanal média de varfarina. Trata-se de um estudo observacional do tipo transversal, conduzido em três clínicas de anticoagulação localizadas na cidade de Belo Horizonte-MG. Os pacientes foram recrutados nos anos de 2014-2015. A coleta de dados envolveu entrevistas com os pacientes e revisão de prontuários médicos. Polimorfismos nos genes, *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* foram genotipados utilizando método de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR). Para análise dos dados, foi desenvolvido um modelo de regressão gama contendo as variáveis significativamente associadas à dose de varfarina. Uma amostra calculada de 315 pacientes foi incluída no estudo. A média de idade foi de 64,1±13,1 anos, e 173 (54,9%) pacientes eram do sexo feminino. A principal indicação de uso de varfarina foi fibrilação atrial/flutter (n=240; 76,2%). A dose de manutenção semanal média de varfarina foi 28,5±13,1mg, e o TTR médio foi 65,5±17,9%. O modelo de regressão revelou que idade, uso de amiodarona, genótipo *VKORC1* GA, genótipo *VKORC1* AA, genótipos *CYP2C9*\*1/\*2 ou \*1/\*3 e genótipos *CYP2C9*\*2/\*2 ou \*2/\*3 ou \*3/\*3 estavam associados com redução na dose de varfarina. Esses resultados sugerem que fatores sociodemográficos, farmacoterápicos e genéticos influenciam na terapia com varfarina. Em conjunto, essas informações permitem obter melhor conhecimento da nossa população, e assim contribuem para subsidiar melhorias no processo de cuidado ao paciente.

**Palavras-chave:** varfarina, polimorfismo genético, *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1*, *APOE*.

## ABSTRACT

Warfarin is the most widely used oral anticoagulant for treatment and prevention of thromboembolic disorders. Therapy monitoring is performed using International Normalized Ratio (INR), and time in therapeutic range (TTR) which is a measure of oral anticoagulation quality. In clinical practice, there is a wide variability in warfarin dose-response that is partially determined by genetic factors. There is evidence that genetic variations on CYP2C9, VKORC1, MDR1 and APOE genes may influence warfarin dose. This study aimed to evaluate sociodemographic, clinical factors and \*1, \*2 and \*3 polymorphisms on CYP2C9 gene, -1639 G>A on VKORC1 gene, 3435 C>T on MDR1 and  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 and  $\epsilon$ 4 on APOE influence at mean weekly warfarin maintenance dose. This is an observational cross-sectional study performed in three anticoagulation clinics in Belo Horizonte-MG. Patients were recruited between 2014-2015. Data were collected through patient interviews and medical chart review. Polymorphisms on CYP2C9, VKORC1, MDR1 and APOE were genotyped using Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). A gamma regression model was developed with variables significantly associated with warfarin dose. A calculated sample of 315 patients was included in the study. Mean age was  $64.1 \pm 13.1$  years, and 173 (54.9%) patients were female. The main indication for warfarin use was atrial fibrillation/flutter (n=240; 76.2%). Mean weekly warfarin maintenance dose was  $28.5 \pm 13.1$ mg, and mean TTR was  $65.5 \pm 17.9\%$ . The regression model revealed that age, amiodarone use, genotype VKORC1 GA, genotype VKORC1 AA, genotypes CYP2C9\*1/\*2 or \*1/\*3 and genotypes CYP2C9\*2/\*2 or \*2/\*3 or \*3/\*3 were associated with warfarin dose reduction. These results suggest that sociodemographic, pharmacotherapeutic and genetic factors influence warfarin therapy. Together, this information allows us to get better knowledge of our population, and thus contribute to subsidize improvements in patient care process.

**Key-words:** warfarin, genetic polymorphism, CYP2C9, VKORC1, MDR1, APOE.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Protocolo de reagentes para qPCR utilizado na determinação dos genótipos de <i>CYP2C9</i> e <i>VKORC1</i> . .....	44
Quadro 2 - Programa utilizado na amplificação para discriminação alélica dos polimorfismos de <i>CYP2C9</i> e <i>VKORC1</i> .....	45
Quadro 3 - Protocolo de reagentes para qPCR utilizado na determinação dos genótipos de <i>MDR1</i> e <i>APOE</i> .....	45
Quadro 4 - Programa utilizado na amplificação para discriminação alélica dos polimorfismos de <i>MDR1</i> e <i>APOE</i> . .....	45



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Carboxilação dos fatores da coagulação acoplada à oxidação da vitamina K.....	19
Figura 2 - Mapa da cidade de Belo Horizonte e indicação das regiões da cidade atendidas pelas clínicas de anticoagulação participantes do estudo. ....	38
Figura 3 - Fluxograma representativo da seleção do grupo amostral.. ....	41

**Artigo: Influência de polimorfismos nos genes CYP2C9, VKORC1, MDR1 e APOE e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação no Brasil**

Figura 1 - Fluxograma representativo da seleção do grupo amostral. ....	68
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendação de doses (mg/dia) estratificada por genótipos (*US Food and Drug Administration*)..... 21

### **Artigo: Influência de polimorfismos nos genes CYP2C9, VKORC1, MDR1 e APOE e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação no Brasil**

Tabela 1 - Características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e farmacoterapêuticas dos pacientes do estudo por clínica de anticoagulação. . 69

Tabela 2 - Frequências alélicas e genótípicas de *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* por clínica de anticoagulação. .... 72

Tabela 3 - Relação dos genótipos de *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* com a dose de manutenção semanal média de varfarina. .... 73

Tabela 4 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas categóricas..... 74

Tabela 5 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas contínuas. .... 77

Tabela 6 - Modelo de regressão gama com função de ligação logarítmica para dose de manutenção semanal média de varfarina (mg/semana)..... 78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB1	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 1</i>
AIT	Ataque isquêmico transitório
ANOVA	Análise de variância
APOE	Apolipoproteína E (gene)
ApoE	Apolipoproteína E (glicoproteína)
Arg	Arginina
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
CYP2C9	Citocromo P450-2C9
CYP4F2	Citocromo P450-4F2
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FA	Fibrilação atrial
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HRTN	Hospital Risoleta Tolentino Neves
IC	Intervalo de confiança
ISI	Índice de sensibilidade internacional
Iso	Isoleucina
ISSN	<i>International Standard Serial Number</i>
Leu	Leucina
MDR1	<i>Multidrug-resistant transporter-1</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>

qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNI	Relação normalizada internacional
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TGI	Trato gastrointestinal
TP	Tempo de protrombina
TTR	<i>Time in therapeutic range</i>
TVP	Trombose venosa profunda
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URS	Unidade de referência secundária
US	<i>United States</i>
VKORC1	Complexo da vitamina K epóxido redutase, subunidade 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 A trombose como distúrbio da coagulação sanguínea .....	16
2.2 As bases farmacológicas da anticoagulação pela varfarina .....	16
2.2.1 Emprego clínico da varfarina .....	16
2.2.2 Farmacocinética .....	17
2.2.3 Farmacodinâmica .....	18
2.2.4 Farmacogenética .....	19
2.2.4.1 Farmacogenética da varfarina .....	20
2.2.4.1.1 CYP2C9 .....	21
2.2.4.1.2 VKORC1 .....	22
2.2.4.1.3 MDR1 .....	23
2.2.4.1.4 APOE .....	24
2.2.4.1.5 A etnia como fator associado à farmacogenética da varfarina .....	26
2.2.5 Efeitos adversos e toxicidade .....	27
2.3 Fatores não-genéticos associados à dose de varfarina .....	28
2.4 Abordagem clínica do paciente em uso de varfarina .....	28
2.4.1 Monitorização .....	28
2.4.1.1 Tempo na faixa terapêutica .....	29
2.4.2 Interações .....	31
2.4.3 O papel das clínicas de anticoagulação .....	31
2.5 Relação custo-efetividade associada à terapia com varfarina .....	32
<b>3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	34
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	35
4.1 Objetivo geral .....	35
4.2 Objetivos específicos .....	35

<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.1 Revisão da literatura .....	36
5.2 Aspectos éticos .....	36
5.3 Desenho e local do estudo .....	37
5.4 Participantes.....	39
5.4.1 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão.....	39
5.4.2 Seleção dos pacientes e cálculo amostral.....	39
5.4.2.1 Distribuição dos pacientes nos três centros .....	40
5.5 Coleta de dados .....	42
5.5.1 Variáveis.....	42
5.5.1.1 Variável dependente.....	42
5.5.1.2 Variáveis independentes .....	43
5.5.2 Genotipagem.....	44
5.6 Análise estatística .....	46
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
6.1 Artigo.....	48
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>ANEXO A</b> – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	89
<b>ANEXO B</b> – Folha de Aprovação da dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical .....	90
<b>APÊNDICE A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
<b>APÊNDICE B</b> – Protocolo para recrutamento dos pacientes.....	93
<b>APÊNDICE C</b> – Protocolo para coleta de dados.....	94
<b>APÊNDICE D</b> – Aceite para apresentação dos resultados parciais em evento científico internacional.....	98

## 1 INTRODUÇÃO

A varfarina é o anticoagulante oral mais amplamente utilizado em pacientes com fatores de risco para distúrbios tromboembólicos (DEAN, 2012; BADER e ELEWA, 2016). O monitoramento da terapia é necessário para auxiliar nos ajustes de dose e evitar a ocorrência de eventos adversos. Além disso, a varfarina apresenta um estreito índice terapêutico, e interage com um grande número de medicamentos (MARTINS *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2016). A monitorização da terapia é realizada por meio da Relação Normalizada Internacional (RNI) calculada a partir da divisão do tempo de protrombina (TP) do paciente pelo TP do controle, cujo valor é elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI, do inglês, *international sensitivity index*) da tromboplastina cálcica de uso (LEE e KLEIN, 2013).

Na prática clínica, existe ampla variação na dose-resposta à varfarina (CAVALLARI *et al.*, 2010). A dose de manutenção pode variar em até 20 vezes entre pacientes (ALMEIDA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017). Essa variação é explicada por fatores sociodemográficos, clínicos e farmacoterapêuticos como idade, sexo, peso corporal, ingestão de alimentos ricos em vitamina K, interações medicamentosas, comorbidades, consumo de álcool e tabagismo, além de fatores genéticos (CAVALLARI *et al.*, 2010; DEAN, 2012; KIM *et al.*, 2013). Polimorfismos nos genes do citocromo P450-2C9 (*CYP2C9*, do inglês, *cytochrome P450-2C9*) e complexo da vitamina K epóxido redutase, subunidade 1 (*VKORC1*, do inglês, *vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1*) são os principais determinantes genéticos dos requerimentos de dose (ALMEIDA *et al.*, 2014).

O gene *CYP2C9* codifica a enzima responsável por metabolizar o isômero mais potente da varfarina (S-varfarina) (JOHNSON *et al.*, 2017). Pacientes carreadores dos alelos variantes mais comuns (*CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3) codificam enzimas com atividades reduzidas levando ao aumento na meia-vida da varfarina, e redução na dose necessária para obtenção do efeito desejado (AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012). Já a variante -1639 G>A em *VKORC1*, localizada na região promotora do gene, também está associada ao aumento na sensibilidade à varfarina (LI, Y. *et al.*, 2015). A presença do alelo A leva à redução

da expressão da enzima alvo da varfarina (vitamina K epóxido redutase) e das exigências de dose do fármaco (JOHNSON e CAVALLARI, 2015; JOHNSON *et al.*, 2017).

Outros genes também têm mostrado associação com a dose de varfarina (ALMEIDA *et al.*, 2014). O gene *Multidrug-resistant transporter-1 (MDR1)* codifica a glicoproteína-P, um transportador de efluxo (KIM *et al.*, 2013), para o qual a varfarina é um substrato. O polimorfismo 3435 C>T em *MDR1* estaria associado ao aumento na necessidade de dose do anticoagulante (ALMEIDA *et al.*, 2011; ISSAC *et al.*, 2014). Apolipoproteína E (*APOE*, do inglês *apolipoprotein E*) é o gene responsável por expressar a proteína de mesmo nome (ApoE) (YU *et al.*, 2016). O transporte e a captação hepática de vitamina K são mediados por lipoproteínas contendo ApoE (KOHNKE *et al.*, 2005; KIMMEL *et al.*, 2008). Os três principais alelos do gene *APOE* ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ ) apresentam diferentes afinidades pelos receptores nos hepatócitos ( $\epsilon 2 < \epsilon 3 < \epsilon 4$ ) (LAL *et al.*, 2008). Em teoria, pacientes carreadores do alelo *APOE*  $\epsilon 4$  necessitariam de doses maiores de varfarina (KOHNKE *et al.*, 2005; KIMMEL *et al.*, 2008). No entanto, os resultados para *MDR1* e *APOE* na literatura são controversos (WADELIUS *et al.*, 2004; KOHNKE *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2014).

Esta pesquisa justifica-se pelo fato de que existem poucos estudos sobre a farmacogenética da varfarina envolvendo a população brasileira. Além disso, os resultados que existem na literatura internacional são bastante divergentes. Com base nisso, objetivou-se investigar a influência de fatores genéticos (polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE*) e não genéticos na dose de manutenção de varfarina na população brasileira. A pergunta norteadora do estudo foi a seguinte: “Polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* alteram a dose de varfarina?”. E partiu-se da hipótese de que polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE*, de forma isolada e/ou integrada, podem alterar a dose de varfarina. Com a realização deste estudo, buscou-se preencher possíveis lacunas no conhecimento, principalmente a respeito do efeito dos genes *MDR1* e *APOE* na dose de varfarina, e trazer contribuições para a literatura científica. Dessa forma, espera-se agregar qualidade à farmacoterapia com esse anticoagulante.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 A trombose como distúrbio da coagulação sanguínea**

A trombose consiste na formação de um coágulo na circulação podendo levar a obstrução parcial ou completa dos vasos sanguíneos (SPRONK *et al.*, 2003). Ela decorre de um desequilíbrio na atividade dos fatores pró e anticoagulantes. Uma ativação excessiva dos fatores pró-coagulantes e/ou uma redução na atividade anticoagulante pode levar ao estado pró-trombótico (TANAKA *et al.*, 2009).

O estado de hipercoagulabilidade pode resultar de mudanças fisiológicas (a incidência de trombose aumenta com a idade), doenças adquiridas (doença ateromatosa), uso de determinados medicamentos (como contraceptivos orais) causas hereditárias (deficiência nos níveis de antitrombina e das proteínas anticoagulantes C e S), distúrbios genéticos (polimorfismo no gene que codifica o fator V, conhecido como fator V de Leiden) (EDELBERG *et al.*, 2001; SPRONK *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2009), e mutante da protrombina.

Após diagnóstico clínico, terapias antitrombóticas profiláticas são necessárias para prevenir a recorrência de trombose (TANAKA *et al.*, 2009). Na década de 1950, os anticoagulantes orais tornaram-se mandatórios na prevenção da doença tromboembólica, sendo a varfarina o anticoagulante oral mais prescrito (TELES *et al.*, 2012).

### **2.2 As bases farmacológicas da anticoagulação pela varfarina**

#### **2.2.1 Emprego clínico da varfarina**

A varfarina é o anticoagulante oral mais amplamente utilizado para tratamento e prevenção de distúrbios tromboembólicos (DEAN, 2012; TELES *et al.*, 2012; SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013; JIN *et al.*, 2014; BADER e ELEWA, 2016). É indicada em pacientes com trombose venosa profunda (TVP), fibrilação atrial (FA), prótese mecânica de valva cardíaca, em pacientes submetidos a cirurgia ortopédica, sendo também utilizada para reduzir o risco de acidente vascular cerebral (AVC) após infarto do miocárdio (DEAN, 2012; LEE e KLEIN, 2013; BADER e ELEWA, 2016).

A FA é um problema de saúde pública e está associada ao maior risco da ocorrência de AVC (a presença de FA aumenta mais que quatro vezes o risco de AVC), tromboembolismo e insuficiência cardíaca (REYNOLDS *et al.*, 2004; MARCOLINO *et al.*, 2015). A ocorrência de FA é estimada em 2,0% em pacientes com idade entre 65 e 75 anos, e 5,0% e 14,0% em pacientes com idade superior a 75 e 84 anos, respectivamente (REYNOLDS *et al.*, 2004). Em pacientes com FA, o uso da varfarina reduz em 64,0% o risco de AVC comparado ao placebo, enquanto agentes antiplaquetários (como a aspirina) promovem uma redução de 22,0% (HART *et al.*, 2007). No Brasil, em estudo conduzido em 658 municípios em Minas Gerais, a prevalência global de FA foi de 1,8%, sendo mais prevalente em homens que em mulheres (2,4% vs. 1,3%;  $p < 0,001$ ), e aumentou acentuadamente com o aumento na idade. Hipertensão e doença de Chagas foram algumas das comorbidades associadas à FA nesses pacientes. Entretanto, apenas 1,5% deles estavam em tratamento com varfarina (MARCOLINO *et al.*, 2015).

O uso da varfarina tem aumentado progressivamente ao longo dos anos devido ao sedentarismo e envelhecimento populacional que predispõem ao tromboembolismo, sendo dispensadas em torno de 30 milhões de prescrições anualmente nos Estados Unidos (BADER e ELEWA, 2016; LOPEZ *et al.*, 2016). Apesar disso, devido a seu estreito índice terapêutico, ampla variação interindividual na sensibilidade ao fármaco e inúmeras interações farmacológicas, a terapia com varfarina precisa ser monitorizada periodicamente (TELES *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013; LOPEZ *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Farmacocinética**

Varfarina é uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos, os enantiômeros R e S, sendo a (S)-varfarina duas a cinco vezes mais potente (AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012). A varfarina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal (TGI), e seu pico de concentração sanguínea ocorre dentro de uma hora após a administração, entretanto, seu efeito farmacológico é alcançado 48 horas depois (AGENO *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012).

A varfarina liga-se fortemente à albumina plasmática e cerca de 3% encontra-se na forma livre e farmacologicamente ativa (FURIE, 2013). Sua meia-vida varia

de 36 a 42 horas e seu efeito dura de dois a cinco dias (AGENO *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012).

A varfarina racêmica se acumula no fígado onde os dois enantiômeros são metabolizados por diferentes vias (AGENO *et al.*, 2012). A S-varfarina é metabolizada principalmente pela enzima microsomal hepática CYP2C9, enquanto a R-varfarina é metabolizada principalmente pelas enzimas citocromo P450-1A2, citocromo P450-3A4 e citocromo P450-2C19. Os metabólitos inativos são excretados na urina e nas fezes (AGENO *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012).

### **2.2.3 Farmacodinâmica**

A varfarina exerce seu efeito anticoagulante por interferir na regeneração da vitamina K reduzida (hidroquinona) a partir de seu epóxido (AGENO *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013). A vitamina K atua como um cofator da enzima gama-glutamil carboxilase responsável por promover a gama-carboxilação de resíduos de glutamato dos fatores da coagulação II, VII, IX e X (DEAN, 2012; FURIE, 2013). A carboxilação dos fatores é essencial para atividade biológica, e o tratamento com varfarina resulta na produção hepática de proteínas descarboxiladas ou parcialmente carboxiladas (AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012; TELES *et al.*, 2012; FURIE, 2013; LEE e KLEIN, 2013).

Nesse processo, a vitamina K reduzida é oxidada (LEE e KLEIN, 2013). O epóxido da vitamina K pode ser novamente reduzido a hidroquinona para ser reutilizado na carboxilação dos fatores da coagulação (AGENO *et al.*, 2012; FURIE, 2013). A reação de oxi-redução envolve um par de redutases, as quais constituem as enzimas alvo da varfarina (**Figura 1**). A vitamina K epóxido redutase é mais sensível à ação da varfarina, ao passo que a vitamina K quinona redutase é menos sensível à inibição pelo fármaco. Isso explica porque a administração de vitamina K pode diminuir o efeito anticoagulante da varfarina (AGENO *et al.*, 2012).

A varfarina não exerce efeito sobre as moléculas totalmente carboxiladas na circulação. Em vista disso, o efeito anticoagulante só é atingido após alguns dias quando os fatores carboxilados pré-formados atingem um novo estado de equilíbrio de acordo com suas meias-vidas de eliminação (TELES *et al.*, 2012).

Os anticoagulantes orais também inibem a carboxilação das proteínas anticoagulantes C e S cuja depleção é mais rápida que a dos fatores II, VII, IX e X, o que pode resultar em um breve período de hipercoagulabilidade no início da terapia, havendo necessidade da utilização concomitante de um anticoagulante de ação rápida (como a heparina) até que o efeito anticoagulante terapêutico seja alcançado (ADAMS e BIRD, 2009; AGENO *et al.*, 2012).

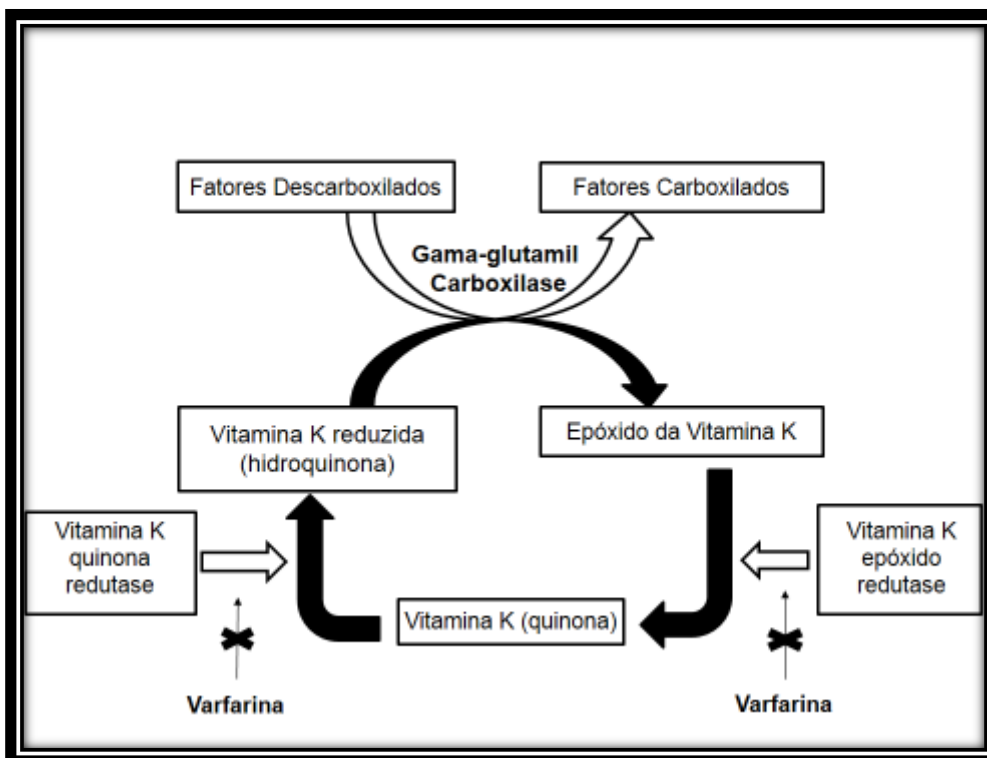


Figura 1 - Carboxilação dos fatores da coagulação acoplada à oxidação da vitamina K. (Adaptado de TELES *et al.*, 2012).

#### 2.2.4 Farmacogenética

Farmacogenética é a área da genética que estuda a influência de determinados genes na resposta individual a determinados fármacos. Essa influência pode vir associada a mudanças na farmacocinética ou farmacodinâmica do medicamento, refletindo em alterações na dose ou na resposta terapêutica. A varfarina é um dos fármacos que apresenta inúmeros estudos farmacogenéticos descritos na literatura. O objetivo desses estudos é investigar quais seriam os principais genes envolvidos na resposta ao anticoagulante e, assim, otimizar a terapia medicamentosa reduzindo a ocorrência de eventos adversos. Busca-se,

também, construir modelos de determinação da dose cada vez mais precisos (CARLQUIST *et al.*, 2010).

#### **2.2.4.1 Farmacogenética da varfarina**

Existe evidência de que fatores genéticos desempenham importante papel na variabilidade da resposta à varfarina (DEAN, 2012; SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013; BENAVIDES *et al.*, 2015; FARZAMIKIA *et al.*, 2017), sendo os genes *CYP2C9* e *VKORC1* os principais determinantes dos requerimentos de dose (SCHAPKAITZ e SITHOLE, 2017). Em 2007, a *US Food and Drug Administration* atualizou as informações sobre prescrição para varfarina indicando que devem ser consideradas doses menores do anticoagulante, no início do tratamento, em pacientes com variações em *CYP2C9* e *VKORC1*, e em 2010, essa recomendação veio acompanhada de uma tabela de estratificação de doses por genótipo (KRISHNA KUMAR *et al.*, 2014; BENAVIDES *et al.*, 2015; MILI *et al.*, 2018) (**Tabela 1**). Polimorfismos nesses dois genes explicam cerca de 18% e 30% da variação na dose em pacientes de descendência europeia, respectivamente (MITROPOULOU *et al.*, 2015; JOHNSON *et al.*, 2017), e em conjunto com fatores sociodemográficos e clínicos são responsáveis por cerca de 60% dessa variabilidade em diferentes populações (ALRASHID *et al.*, 2016).

Polimorfismos em outros genes também contribuem para variação interindividual na dose-resposta à varfarina, porém em menor escala (LEE e KLEIN, 2013). O polimorfismo 3435 C>T em *MDR1* foi responsável por explicar cerca de 3,0% da variação na dose em uma coorte de pacientes egípcios (ISSAC *et al.*, 2014), enquanto *APOE* rs7412 teve coeficiente de determinação de 1,7% em estudo conduzido com pacientes chineses (LIU *et al.*, 2017). A enzima citocromo P450-4F2, expressa pelo gene *CYP4F2*, é responsável pela metabolização hepática da vitamina K. O polimorfismo V433M (rs2108622) leva a reduzidas concentrações da enzima *CYP4F2* e conseqüente redução no metabolismo da vitamina K. É esperado que pacientes que exibam essa variação necessitem de doses maiores de varfarina para o efeito anticoagulante (JOHNSON e CAVALLARI, 2015). Um coeficiente de determinação de 1,9% foi obtido para esse polimorfismo em estudo conduzido na Índia (KRISHNA KUMAR *et al.*, 2014). A interação entre genes também é um fator que pode contribuir para a

variabilidade na dose de varfarina. Estudos têm mostrado resultados inconsistentes sobre a interação entre os genes *CYP2C9* e *VKORC1* na terapia com esse fármaco (LI, X. *et al.*, 2015; KHALIGHI *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Recomendação de doses (mg/dia) estratificada por genótipos (*US\* Food and Drug Administration*).

VKORC1	CYP2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
<b>GG</b>	5 – 7	5 – 7	3 – 4	3 – 4	3 – 4	0,5 – 2
<b>GA</b>	5 – 7	3 – 4	3 – 4	3 – 4	0,5 – 2	0,5 – 2
<b>AA</b>	3 – 4	3 – 4	0,5 – 2	0,5 – 2	0,5 – 2	0,5 – 2

Fonte: DEAN (2012). \*US: *United States*

#### 2.2.4.1.1 CYP2C9

CYP2C9 é a enzima hepática responsável por metabolizar a S-varfarina (JOHNSON *et al.*, 2017). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) no gene que codifica essa enzima (gene *CYP2C9*, localizado em 10q23.33) afetam a farmacocinética do anticoagulante (BOTTON *et al.*, 2011). CYP2C9\*1 é o alelo selvagem e está associado a uma atividade enzimática normal (DEAN, 2012), enquanto as variantes mais comuns CYP2C9\*2 (430C>T; Arg144Cys; rs1799853) no exon 3 e CYP2C9\*3 (1075A>C; Iso359Leu; rs1057910) no exon 7 estão associadas à redução na atividade da proteína (BOTTON *et al.*, 2011; AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012).

Os polimorfismos CYP2C9\*2 e \*3 levam à expressão de enzimas com atividades reduzidas e debilitada capacidade de metabolizar a S-varfarina, ocasionando a redução no *clearance* desse isômero e, conseqüentemente, o aumento em sua meia vida (AGENO *et al.*, 2012). Em comparação com indivíduos homocigotos para o alelo selvagem CYP2C9\*1, indivíduos heterocigotos (CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*1/\*3, CYP2C9\*2/\*3) ou homocigotos (CYP2C9\*2/\*2, CYP2C9\*3/\*3) para os alelos variantes necessitam de doses menores de varfarina para adequada anticoagulação (AGENO *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2017).

Os alelos CYP2C9\*2 ou CYP2C9\*3 estão associados com atividades reduzidas da enzima em 30% e 80% em relação ao alelo selvagem, respectivamente (LEE

e KLEIN, 2013), e as reduções nas doses estão em torno de 14% para carreadores heterozigotos de CYP2C9\*2 e 21% para carreadores heterozigotos de CYP2C9\*3 (LOPEZ *et al.*, 2016). Comparado a indivíduos homozigotos para CYP2C9\*1, pacientes que carregam pelos menos uma cópia dos alelos variantes apresentam maior risco de sangramento no início do tratamento com varfarina e requerem um tempo maior para alcançar a RNI terapêutica (LEE e KLEIN, 2013; KUDZI *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 2017).

Polimorfismos em CYP2C9 explicam cerca de 5-20% da variação na dose de varfarina (BAZAN *et al.*, 2014). No Brasil, em estudo conduzido com 279 pacientes usuários de varfarina de ascendência europeia da região sul, a frequência dos genótipos CYP2C9\*1/\*1, CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*1/\*3, CYP2C9\*2/\*2 e CYP2C9\*2/\*3 foram, respectivamente, 65,2%, 22,9%, 9,0%, 1,1% e 1,8%, enquanto que o genótipo CYP2C9\*3/\*3 não foi detectado (BOTTON *et al.*, 2011). Almeida *et al.* (2014) encontraram que as frequências dos alelos CYP2C9\*1, CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 foram 86,6%, 9,1% e 4,3%, respectivamente, em estudo envolvendo 116 pacientes usuários de varfarina atendidos no Ambulatório de Hematologia dos Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, enquanto que frequências de 12,9% para o alelo CYP2C9\*2 e 3,2% para CYP2C9\*3 foram detectadas em estudo conduzido com 206 pacientes usuários de varfarina recrutados de um hospital universitário na cidade de São de Paulo (SANTOS *et al.*, 2013).

#### **2.2.4.1.2 VKORC1**

A varfarina atua inibindo a ação da enzima vitamina K epóxido redutase que, por sua vez é codificada pelo gene *VKORC1* localizado no cromossomo 16p11.2 (AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012; LOPEZ *et al.*, 2016; KHALIGHI *et al.*, 2017; RAFIEE *et al.*, 2017). Polimorfismos em *VKORC1* afetam a farmacodinâmica da varfarina (AGENO *et al.*, 2012; CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Um desses polimorfismos tem mostrado significativo efeito na resposta ao fármaco (QAYYUM *et al.*, 2018). O SNP *VKORC1* -1639 G>A (rs9923231), localizado na região promotora do gene, está associado ao aumento na sensibilidade à varfarina (DEAN, 2012; LI, Y. *et al.*, 2015). A presença do alelo

variante A associa-se a expressão gênica aproximadamente duas vezes menor e significativa redução das exigências de dose em comparação com o alelo G (JOHNSON e CAVALLARI, 2015). Conseqüentemente, pacientes carreadores de uma ou duas cópias de -1639A requerem doses menores de varfarina do que pacientes homozigotos para -1639G (JOHNSON *et al.*, 2017), sendo uma redução aproximada de 28% para cada cópia do alelo variante (LOPEZ *et al.*, 2016).

O SNP VKORC1 -1639 G>A explica cerca de 20-25% da variação na dose de varfarina (GHOZLAN *et al.*, 2015), e juntos, variantes em VKORC1 e CYP2C9 explicam em torno de 20-40% dessa variabilidade (ERIKSSON *et al.*, 2016). No Brasil, Botton *et al.* (2011) detectaram frequências de 40,2% para o genótipo GG, 46,2% para o genótipo GA e 13,6% para o genótipo AA do polimorfismo -1639 G>A de VKORC1, em estudo conduzido com pacientes usuários de varfarina da região sul, enquanto Santos *et al.* (2013) encontraram frequências, respectivamente, de 59,7%, 27,2% e 13,1% em pacientes em uso de varfarina recrutados na cidade de São Paulo. Neste último estudo, a frequência do alelo polimórfico -1639A foi de 26,7% (SANTOS *et al.*, 2013). Em estudo conduzido com pacientes usuários de varfarina de Belo Horizonte, as frequências dos genótipos GG, GA e AA de VKORC1 -1639 G>A foram, respectivamente, 51,7%, 44,8%, e 3,5%, enquanto a frequência do alelo A foi de 25,0% (ALMEIDA *et al.*, 2014).

#### 2.2.4.1.3 MDR1

O gene *MDR1* (ou *ABCB1*, do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family B, member 1*), localizado no cromossomo 7q21.12, codifica uma proteína transmembrana denominada glicoproteína-P expressa em uma variedade de tecidos incluindo fígado, rins e intestino (WADELIUS *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2013; ISSAC *et al.*, 2014; GSCHWIND *et al.*, 2015). A glicoproteína-P atua como um potente transportador de efluxo de compostos lipofílicos e é considerada a principal proteína responsável por interferir na absorção de fármacos administrados por via oral, e na excreção de seus metabólitos (WADELIUS *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013; FERRARI *et al.*, 2014; ISSAC *et al.*, 2014).



A varfarina é um substrato para glicoproteína-P, e polimorfismos em *MDR1* podem alterar a farmacocinética e biodisponibilidade desse fármaco (WADELIUS *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2014; ISSAC *et al.*, 2014). O polimorfismo 3435 C>T (rs1045642) no exon 26 estaria associado à redução da absorção intestinal da varfarina e aumento em sua eliminação hepática em pacientes carreadores do genótipo T3435T, o que levaria ao aumento das necessidades de dose do anticoagulante (ALMEIDA *et al.*, 2011; ISSAC *et al.*, 2014). Entretanto, o impacto de SNPs em *MDR1*, na expressão da glicoproteína-P e na farmacocinética de diferentes fármacos permanece em discussão (GSCHWIND *et al.*, 2015). Estudos sugerem que polimorfismos em *ABCB1* levariam a redução da expressão do gene e consequente aumento na biodisponibilidade da varfarina (FERRARI *et al.*, 2014).

No Brasil, em estudo conduzido com 110 pacientes usuários de varfarina, com ocorrência ou recorrência de TVP, e acompanhados na clínica de anticoagulação do Hospital das Clínicas da UFMG, detectou-se frequências de 14%, 40% e 46% para os genótipos C3435C, C3435T e T3435T de *MDR1*, respectivamente. Nesse estudo, a frequência do alelo variante 3435T foi de 66% (ALMEIDA *et al.*, 2011).

#### **2.2.4.1.4 APOE**

A ApoE é uma glicoproteína contendo 299 aminoácidos, sintetizada principalmente no fígado e intestino, e codificada pelo gene *APOE* localizado no cromossomo 19 (LAL *et al.*, 2006; LAL *et al.*, 2008; LOPEZ *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016). ApoE é a principal constituinte de lipoproteínas presentes na circulação responsáveis pelo transporte de substâncias lipídicas para os mais diversos tecidos (KOHNKE *et al.*, 2005; SCONCE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016).

Uma dessas lipoproteínas, os remanescentes de quilomícrons, são produzidos na circulação sanguínea e estão envolvidos no transporte de vitamina K (fitomenadiona) do intestino até o fígado (LAL *et al.*, 2006). A ApoE é expressa na superfície desses quilomícrons, e interage com receptores nos hepatócitos mediando a endocitose de toda a molécula (KOHNKE *et al.*, 2005; LAL *et al.*,

2006; LAL *et al.*, 2008). Nos hepatócitos, a vitamina K irá atuar no ciclo de carboxilação dos fatores da coagulação (KOHNKE *et al.*, 2005).

Uma vez que a varfarina exerce seu efeito anticoagulante inibindo a regeneração da vitamina K reduzida, a disponibilidade dessa vitamina no fígado pode afetar os requerimentos de dose do fármaco (KIMMEL *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016; RAFIEE *et al.*, 2017). A captação hepática dos quilomícrons e, conseqüentemente de vitamina K, é parcialmente dependente da ApoE (SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013).

O gene da ApoE localiza-se no cromossomo 19q13.32. Dois SNPs presentes no exon 4 deste gene, os polimorfismos rs429358 (334 T>C) e rs7412 (472 C>T), dão origem a três alelos  $\epsilon 2$  (334T, 472T),  $\epsilon 3$  (334T, 472C) e  $\epsilon 4$  (334C, 472C), que por sua vez codificam proteínas com diferentes afinidades pelos receptores nos hepatócitos (afinidade de  $\epsilon 2 < \epsilon 3 < \epsilon 4$ ) (KOHNKE *et al.*, 2005; LAL *et al.*, 2006; LAL *et al.*, 2008; CAVALLARI *et al.*, 2010; SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013; LOPEZ *et al.*, 2016). Isso resulta em diferentes níveis de captação hepática de vitamina K, estando  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  associados a baixa, intermediária e elevada captação, respectivamente (WADELIUS *et al.*, 2007; KIMMEL *et al.*, 2008; CAVALLARI *et al.*, 2010; CAVALLARI *et al.*, 2011; SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013).

Em teoria, devido à acelerada captação de vitamina K pelo fígado, indivíduos carreadores do alelo APOE  $\epsilon 4$  necessitariam de uma dose maior de varfarina para promover o efeito anticoagulante. Entretanto, os resultados na literatura são controversos, e alguns estudos sugerem que a presença do  $\epsilon 4$  levaria à redução da necessidade de dose dos anticoagulantes cumarínicos uma vez que além de promover a captação elevada de vitamina K, esse alelo também estaria associado a um desvio de rota mediando a direta eliminação da vitamina K captada, diminuindo, portanto, sua disponibilidade hepática para atuar no ciclo de carboxilação dos fatores da coagulação (KOHNKE *et al.*, 2005; VISSER *et al.*, 2005; KIMMEL *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2016).

Existem seis genótipos possíveis de APOE,  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 3$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$  cujas frequências determinadas em pacientes brasileiros usuários de varfarina foram, respectivamente, 0,8%, 14,7%, 1,7%, 56,9%, 22,5% e 3,4%,

sendo as frequências de  $\epsilon_2$  9,1%, de  $\epsilon_3$  75,4% e de  $\epsilon_4$  15,0% (ALMEIDA *et al.*, 2014).

#### **2.2.4.1.5** A etnia como fator associado à farmacogenética da varfarina

Existe ampla variação nas frequências dos polimorfismos genéticos, que é etnicamente determinada (GAIKWAD *et al.*, 2013), e o poder de explicação e efeito na variabilidade da dose de varfarina varia consideravelmente em diferentes populações (SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2013; BADER e ELEWA, 2016). A variante CYP2C9\*2 é quase ausente na população asiática (frequência de 1-3%), sendo mais comum em caucasianos (10-20%) (DEAN, 2012; LEE e KLEIN, 2013). O alelo CYP2C9\*3 é extremamente raro na população africana, e polimorfismos como CYP2C9\*5, \*6, \*8 e \*11 apresentam significativas contribuições para os requerimentos de dose em afro-americanos (CAVALLARI *et al.*, 2010; DEAN, 2012).

Para o SNP VKORC1 -1639 G>A, a frequência do alelo variante é maior em asiáticos (frequência em torno de 90%), apresentando frequência intermediária em caucasianos (40%), e mais baixa frequência em afro-americanos (14%) (DEAN, 2012; JOHNSON e CAVALLARI, 2015). Isso explica porque pacientes asiáticos são mais sensíveis à varfarina e requerem doses menores do anticoagulante para a mesma faixa de RNI alvo que caucasianos e afro-americanos (JIN *et al.*, 2014; JOHNSON e CAVALLARI, 2015; LI, S. *et al.*, 2015).

No Brasil, a população é heterogênea, sendo resultado da miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios, e mais recentemente por asiáticos. Isso explica as diferenças na distribuição de polimorfismos genéticos nas diferentes regiões do país, bem como dentro dos diferentes grupos étnicos, o que torna a implementação da farmacogenética na prática clínica um desafio (FRIEDRICH *et al.*, 2014; SUAREZ-KURTZ e BOTTON, 2015).

Uma vez que a etnia é um fator que interfere no efeito de variáveis clínicas e genéticas na dose de varfarina, a construção de modelos de predição da dose deve levar em consideração aspectos específicos de cada população (como as frequências dos alelos mais comuns e importantes), sendo esses algoritmos os

que determinam com maior precisão a dose do anticoagulante (LIMDI *et al.*, 2015).

### **2.2.5 Efeitos adversos e toxicidade**

A varfarina é um dos principais medicamentos associados a internações secundárias a eventos adversos nos Estados Unidos e, entre 2007 e 2009, foi responsável por cerca de 33% das hospitalizações (LEE e KLEIN, 2013; JOHNSON e CAVALLARI, 2015; PRICE, 2015; AZZAM *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 2017).

Sangramento é o efeito adverso mais importante e mais comum relacionado à terapia com varfarina (WADELIUS *et al.*, 2004; TELES *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013; JIN *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016). A incidência mediana de hemorragias graves é de 2,1 por 100 pacientes por ano em usuários de anticoagulantes cumarínicos (LOPEZ *et al.*, 2016). Indicação da anticoagulação, RNI alvo, idade igual ou superior a 65 anos, histórico de hemorragias, e uso de medicamentos com potencial de interação com a varfarina são alguns dos fatores que influenciam na taxa de sangramento (WADELIUS *et al.*, 2004; AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012).

A incidência de hemorragia também está relacionada com a intensidade da terapia anticoagulante, de modo que valores da RNI maiores que quatro e, principalmente maiores que cinco, aumentam acentuadamente o risco de um evento hemorrágico (WADELIUS *et al.*, 2004; AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012; LEE e KLEIN, 2013; YU *et al.*, 2016). O risco de sangramento é dez vezes maior no primeiro mês de tratamento, e alguns estudos sugerem que pacientes portadores de variações alélicas para *CYP2C9* apresentam maior incidência de hemorragias em relação a pacientes homocigotos selvagens (WADELIUS *et al.*, 2004).

Na ocorrência de sangramento grave, principalmente, o tratamento consiste na suspensão do anticoagulante, administração de vitamina K (fitomenadiona), plasma fresco ou concentrado de fatores da coagulação (AGENO *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013).

Outras reações adversas à terapia com varfarina incluem diarreia, alopecia, necrose cutânea, síndrome púrpura do dedo do pé e reações de hipersensibilidade (AGENO *et al.*, 2012; DEAN, 2012; TELES *et al.*, 2012).

### **2.3 Fatores não-genéticos associados à dose de varfarina**

Existe ampla variação interindividual na resposta farmacológica à varfarina. A dose necessária para manter uma anticoagulação adequada pode variar em torno de 20 vezes entre pacientes (ALMEIDA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017). Idade, sexo, peso corporal, ingestão de alimentos ricos em vitamina K, interações medicamentosas, comorbidades, consumo de álcool e tabagismo são alguns dos fatores sociodemográficos e clínicos associados à dose do anticoagulante (LAL *et al.*, 2006; CAVALLARI *et al.*, 2010; DEAN, 2012; FURIE, 2013; KIM *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2013; BENAVIDES *et al.*, 2015; KUDZI *et al.*, 2016; FARZAMIKIA *et al.*, 2017). Juntos, esses fatores podem explicar entre 17-30% da variabilidade na dose de varfarina (LOPEZ *et al.*, 2016; SCHAPKAITZ e SITHOLE, 2017).

No geral, mulheres necessitam de doses mais baixas que homens, enquanto um aumento na ingestão de vitamina K leva a requerimentos de doses maiores. Além disso, pacientes idosos utilizam doses menores que pacientes mais jovens (WADELIUS *et al.*, 2004; KUDZI *et al.*, 2016). Um estudo mostrou correlação positiva entre altura do indivíduo e dose de varfarina (coeficiente de correlação de Pearson=0,855,  $p<0,001$ ) (GHOZLAN *et al.*, 2015). Redução de 12,0% na dose foi relacionada ao aumento na idade em pacientes egípcios, enquanto um acréscimo de 8,1% foi associado ao tabagismo. A presença de FA levou à redução de 11,0% nos requerimentos de dose nesses mesmos pacientes (BAZAN *et al.*, 2014). O consumo crônico de álcool tem potencial de aumentar o *clearance* da varfarina (AGENO *et al.*, 2012).

### **2.4 Abordagem clínica do paciente em uso de varfarina**

#### **2.4.1 Monitorização**

A varfarina é um fármaco que apresenta estreito índice terapêutico e ampla variação interindividual nos requerimentos de dose (SUAREZ-KURTZ e

BOTTON, 2013; ERIKSSON *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016). Em detrimento disso, a terapia com varfarina precisa ser monitorizada por meio da determinação da RNI, a qual está diretamente relacionada ao TP do paciente (LEE e KLEIN, 2013; FERRARI *et al.*, 2014; BENAVIDES *et al.*, 2015; SERMSATHANASAWADI *et al.*, 2015).

O objetivo da terapia anticoagulante é manter a RNI dentro da faixa terapêutica, uma vez que RNIs acima dessa faixa estão associados ao aumento no risco de sangramento, e o risco de eventos tromboembólicos aumenta com RNIs abaixo do alvo terapêutico (FURIE, 2013; GAIKWAD *et al.*, 2013; SERMSATHANASAWADI *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2016; CHOWDHURY *et al.*, 2017; RAFIEE *et al.*, 2017). Para a maioria das indicações, é recomendada a RNI alvo na faixa de 2,00-3,00 podendo ter indicação de RNI alvo mais elevada (2,50-3,50) em pacientes com próteses mecânicas de valvas cardíacas (KUDZI *et al.*, 2016).

A determinação do TP envolve a adição de cálcio e tromboplastina a plasma citratado, e a RNI é calculada dividindo-se o TP do paciente pelo TP de um *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis (AGENO *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013). Uma vez que diferentes tromboplastinas apresentam diferentes sensibilidades à redução dos fatores da coagulação dependentes da vitamina K, cada tromboplastina recebe um ISI como forma de padronizar o cálculo da RNI (AGENO *et al.*, 2012; BENAVIDES *et al.*, 2015). O ISI é determinado por cada fabricante de tromboplastina com base no desempenho desta frente à uma preparação de tromboplastina de referência internacional. Dessa forma, o uso de tromboplastinas com ISI reduziu drasticamente as discrepâncias entre os diversos laboratórios clínicos que usavam reagentes não padronizados pela tromboplastina de referência internacional. As medidas do TP são convertidas em RNI pela seguinte equação:

$$RNI = \left[ \frac{TP_{\text{paciente}}}{TP_{\text{referência}}} \right]^{ISI}$$

#### **2.4.1.1 Tempo na faixa terapêutica**

A qualidade do controle da anticoagulação oral pode ser obtida por meio da medida da proporção do tempo em que o paciente se mantém dentro da faixa

terapêutica de RNI, sendo esse parâmetro denominado tempo na faixa terapêutica (TTR, do inglês, *time in therapeutic range*). Um adequado controle da anticoagulação é importante para minimizar os riscos de eventos hemorrágicos e tromboembólicos (SILVA *et al.*, 2017), sendo recomendado um valor de TTR acima de 60,0% (CONNOLLY *et al.*, 2008). O TTR geralmente é calculado pelo método proposto por Rosendaal (ROSENDAAL *et al.*, 1993) que utiliza a interpolação linear de valores consecutivos da RNI (CONNOLLY *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2017).

Connolly *et al.* (2008) conduziram um estudo envolvendo pacientes de 15 países, e concluíram que TTR mínimo de 58,0% seria necessário para assegurar uma boa qualidade da anticoagulação oral. Pacientes atendidos por instituições com TTRs médios acima da mediana de 65,0% obtiveram benefícios no uso da varfarina para prevenção de AVC e eventos vasculares totais.

White *et al.* (2007) dividiram os pacientes de seu estudo em três grupos de acordo com os valores de TTR associados ao controle da anticoagulação oral: controle adequado (TTR>75,0%), controle moderado (TTR entre 60,0% e 75,0%) e controle inadequado (TTR<60,0%). Pacientes com TTR<60,0% apresentaram taxas anuais de mortalidade (4,2%) e sangramentos (3,9%) mais altas quando comparadas a pacientes nos grupos de controle moderado (1,8% e 2,0%, respectivamente) e adequado (1,7% e 1,6%, respectivamente) ( $p<0,01$ ) (WHITE *et al.*, 2007).

Em estudo conduzido em clínicas de anticoagulação de dois hospitais brasileiros, os pacientes foram classificados como tendo anticoagulação adequada (TTR $\geq$ 60,0%) ou inadequada (TTR<60,0%). Trezentos e quarenta e quatro pacientes (61,6%) tiveram TTR $\geq$ 60%. A mediana do TTR foi de 64,3% demonstrando controle adequado da anticoagulação oral nessas instituições. Uma das razões apontadas para tal envolve a alta qualidade nos procedimentos de cuidado e a presença de equipe multidisciplinar que conta com farmacêuticos como suporte nos atendimentos, exercendo papel crucial na educação do paciente, na realização de ajustes de dose e no monitoramento de interações medicamentosas (SILVA *et al.*, 2017), e, eventualmente, com alimentos e uso de plantas medicinais.

### **2.4.2 Interações**

Existe grande número de medicamentos que interfere na ação da varfarina, e os anticoagulantes orais estão entre os fármacos com maior número de interações medicamentosas (MARTINS *et al.*, 2011; AGENO *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012; KHALIGHI *et al.*, 2017).

Amiodarona é um potente inibidor do metabolismo de ambos os isômeros da varfarina, o que potencializa seu efeito anticoagulante, e redução na dose de varfarina é requerida em pacientes utilizando concomitantemente esses dois fármacos (AGENO *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013). Por outro lado, carbamazepina e fenitoína aumentam o *clearance* da varfarina através da indução de enzimas hepáticas, inibindo seu efeito anticoagulante (AGENO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015).

Fármacos como ácido acetilsalicílico e anti-inflamatórios não-esteroidais aumentam o risco de sangramentos quando em uso concomitante à varfarina por inibirem a função plaquetária e produzirem erosões no TGI (AGENO *et al.*, 2012; LEE e KLEIN, 2013).

Em estudo conduzido em um hospital brasileiro localizado na cidade do Rio de Janeiro, observou-se que o uso de amiodarona e sinvastatina estava associado à necessidade de redução na dose de varfarina. Essas duas co-variáveis tiveram um coeficiente de determinação de 6,6% quando incluídas no algoritmo de predição de dose construído para essa população (PERINI *et al.*, 2008).

O método mais efetivo para se evitar eventos adversos associados a interações medicamentosas é utilizar alternativas que não interajam com a varfarina, se possível. Caso contrário, recomenda-se aumentar a frequência de monitoramento da RNI e realizar ajustes de dose, quando necessário (MARTINS *et al.*, 2011; AGENO *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2012).

### **2.4.3 O papel das clínicas de anticoagulação**

Clínicas de anticoagulação são serviços projetados para monitorizar a terapia anticoagulante por meio do acompanhamento do paciente, procedimentos de educação em saúde, monitoramento da RNI e de possíveis interações medicamentosas, e realização de ajustes de dose (WILSON *et al.*, 2003).



Uma metanálise de oito estudos avaliando a qualidade do controle da terapia anticoagulante em pacientes norte-americanos com FA sugeriu que pacientes acompanhados por clínicas de anticoagulação passavam 63% [Intervalo de Confiança (IC) 95% = 58%-68%] do tempo dentro da faixa terapêutica de RNI comparado a 51% (IC 95% = 47%-55%) de pacientes tratados na atenção primária à saúde, sem atendimento por clínica de anticoagulação (BAKER *et al.*, 2009).

Wilson *et al.* (2003) conduziram um ensaio clínico randomizado onde os pacientes foram acompanhados por um período de três meses. Quando acompanhados por clínicas de anticoagulação, os pacientes passavam 82% (IC 95% = 78%-85%) do tempo dentro da faixa terapêutica, ao passo que um valor de 76% (IC 95% = 72%-80%) foi encontrado para pacientes tratados com médicos de família. Além disso, uma porcentagem menor de pacientes obteve valores extremos de RNI (<1,5 ou >5,0) no grupo atendido pelas clínicas de anticoagulação [30% (IC 95% = 22%-40%) vs. 40% (IC 95% = 39%-59%)].

Em uma revisão sistemática e meta-regressão envolvendo 67 estudos, demonstrou-se que o “cenário do estudo” (*study setting*) é um importante fator determinante do TTR, e que as clínicas de anticoagulação oferecem melhor controle da RNI, de modo que pacientes passam 66% (IC 95% = 63,7%-67,7%) do tempo dentro da faixa terapêutica quando acompanhados por essas clínicas, em comparação aos 57% (IC 95% = 51,5%-62,0%) quando tratados pelos cuidados médicos habituais (VAN WALRAVEN *et al.*, 2006).

Dessa forma, esses estudos evidenciaram o impacto positivo desses serviços no cuidado especializado do paciente em uso de varfarina e na melhoria da qualidade ao tratamento.

## **2.5 Relação custo-efetividade associada à terapia com varfarina**

A avaliação econômica de uma terapia guiada pelo genótipo permite determinar o custo-benefício do tratamento para o paciente. O custo do teste de genotipagem na Croácia foi estimado em 140,25 euros por paciente. Em ensaio clínico randomizado conduzido com 206 pacientes croatas, realizou-se uma análise de custo-efetividade da terapia com varfarina levando em consideração

as variantes genéticas em *CYP2C9* e *VKORC1* (grupo 1) em comparação com um grupo controle composto por 102 pacientes que não foram genotipados (grupo 2). Os pacientes dos dois grupos foram acompanhados por um período de seis meses, sendo a dose inicial de varfarina determinada por um algoritmo farmacogenético no grupo 1 e padronizada em 6,0mg/dia no grupo 2. Posteriores ajustes de dose foram realizados com base em valores da RNI. No grupo 1, o tempo para alcançar a RNI alvo e a dose de manutenção de varfarina foram menores em comparação ao grupo 2 (5,6 vs. 7,1 dias e 10,4 vs. 13,9 dias, respectivamente). O custo total da terapia por paciente no grupo 1 foi maior que no grupo 2 (187,68 vs. 172,07 euros), entretanto essa diferença não foi significativa, e o custo da genotipagem foi o que mais contribuiu para os gastos totais naquele grupo. Uma vez que no grupo controle a ocorrência de eventos hemorrágicos foi maior, o custo médio envolvendo esses eventos foi estimado em torno de 147,39 euros nesse grupo em comparação com 28,07 euros no outro grupo. Em conclusão, a terapia com varfarina guiada pelo genótipo foi custo efetiva na população do estudo principalmente em relação à prevenção de eventos hemorrágicos (MITROPOULOU *et al.*, 2015).

Assim, a incorporação de fatores genéticos na terapia com varfarina tem potencial de trazer benefícios para o paciente principalmente no início do tratamento, e minimizar o risco de efeitos adversos e os custos (BENAVIDES *et al.*, 2015; JOHNSON *et al.*, 2017). Entretanto, a genotipagem é ainda um procedimento de alto custo, e seus potenciais benefícios têm produzido resultados inconsistentes na literatura (JOHNSON *et al.*, 2017). Na prática clínica, não é custo efetivo genotipar todos os pacientes iniciando a terapia com varfarina, e os principais beneficiados seriam pacientes que requerem baixas ( $\leq 21,0$ mg/semana) ou altas doses ( $\geq 49,0$ mg/semana) do fármaco (SCHAPKAITZ e SITHOLE, 2017).

### 3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Esse trabalho objetivou avaliar a influência da farmacogenética e variáveis sociodemográficas e clínicas na terapia com varfarina na população atendida em clínicas de anticoagulação. Este estudo envolveu pacientes diagnosticados com FA, considerado um problema de saúde pública, e cuja prevalência tem aumentado com o envelhecimento populacional. Em decorrência da elevada miscigenação encontrada na população brasileira, estudos desenvolvidos em outros países, muitas vezes não são replicados aqui. Além disso, foram recrutados pacientes de três clínicas de anticoagulação em Belo Horizonte, o que torna a amostra mais representativa, levando-se em consideração fatores clínicos característicos dos pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e em uso de varfarina. Também, foram analisados polimorfismos em dois genes (*MDR1* e *APOE*) pouco estudados na população brasileira e com resultados controversos na literatura internacional. Portanto, com o estudo da influência de fatores sociodemográficos, clínicos e genéticos na terapia com varfarina, buscou-se trazer melhor conhecimento da nossa população, e assim contribuir para subsidiar melhorias no processo de cuidado ao paciente, uma vez que, no Brasil, a varfarina permanece sendo o anticoagulante oral mais utilizado visto que é o único amplamente distribuído pelo SUS (RENAME, 2017).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar os fatores genéticos e não genéticos associados à dose de manutenção de varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação em Belo Horizonte.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar as características sociodemográficas, comportamentais, clínicas, farmacoterápicas e genéticas dos participantes do estudo por clínica de anticoagulação e de toda a população;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos \*1, \*2 e \*3 para o gene *CYP2C9*, -1639 G>A para o gene *VKORC1*, 3435 C>T de *MDR1* e  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4 para *APOE* na mesma população;
- Avaliar, por meio de um modelo multivariado, as variáveis independentemente associadas à dose de manutenção de varfarina, e determinar seu efeito individual sobre a dose.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Revisão da literatura

Para fundamentação teórica do presente estudo, foi realizada uma pesquisa na base de dados *PubMed* com o objetivo de selecionar artigos abordando a influência de fatores genéticos e não genéticos na dose de varfarina. Os fatores genéticos de interesse incluíram os seguintes genes: *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE*. Foram utilizados termos indexados no *Medical Subject Headings* (MeSH) e termos não indexados.

A estratégia de busca empregada foi a seguinte: “((((("Warfarin"[Mesh]) OR "Anticoagulants"[Mesh:noexp]) OR ((Warfarin[Title/Abstract] OR Anticoagulants[Title/Abstract] OR Anticoagulant[Title/Abstract] OR "oral anticoagulant"[Title/Abstract] OR "INR"[Title/Abstract]))) AND (((((((("Cytochrome P-450 CYP2C9"[Mesh]) OR "Polymorphism, Single Nucleotide"[Mesh]) OR "Vitamin K Epoxide Reductases"[Mesh]) OR "Apolipoprotein E4"[Mesh]) OR "Genes, MDR"[Mesh]))) OR (("Cytochrome P-450 CYP2C9"[Title/Abstract] OR "CYP2C9"[Title/Abstract] OR "Single Nucleotide Polymorphisms"[Title/Abstract] OR "SNPs"[Title/Abstract] OR "VKORC1"[Title/Abstract] OR "Vitamin K Epoxide Reductases"[Title/Abstract] OR "vitamin K epoxide reductase"[Title/Abstract] OR "Apolipoprotein E4"[Title/Abstract] OR "Apolipoprotein E"[Title/Abstract] OR "APOE"[Title/Abstract] OR "MDR Genes"[Title/Abstract] OR "MDR Gene"[Title/Abstract] OR "Multidrug Resistance Gene"[Title/Abstract] OR "Multidrug Resistance Genes"[Title/Abstract] OR "MDR1"[Title/Abstract] OR "multidrug resistance 1"[Title/Abstract])))”).

Os critérios de inclusão dos artigos foram: estudos envolvendo pacientes adultos, investigação de pelo menos um dos genes citados, período de publicação compreendido entre 1984 e 2018, idiomas inglês, português ou espanhol.

### 5.2 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de um estudo mais amplo intitulado “Fatores de risco para complicações da anticoagulação oral em pacientes com doenças

cardiovasculares atendidos em ambulatórios de referência em Belo Horizonte: um estudo de coorte”. Essa pesquisa foi desenvolvida de acordo com os termos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 18 de dezembro de 2013 sob o parecer CAAE 08136613.4.0000.5149 (**Anexo A**). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**). Assegurou-se aos participantes que nenhuma forma de identificação individual seria exposta.

### **5.3 Desenho e local do estudo**

Trata-se de um estudo observacional do tipo transversal desenvolvido em clínicas especializadas no controle da anticoagulação oral do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN), e da Unidade de Referência Secundária (URS) Sagrada Família. Todos os centros são considerados referência para o SUS no município de Belo Horizonte.

O HC-UFMG é um hospital universitário que realiza atividades assistenciais, de ensino, pesquisa e extensão. Ele se localiza na região centro-sul de Belo Horizonte. A clínica de anticoagulação foi implantada em 2009 e está localizada no anexo Borges da Costa do HC-UFMG. A clínica de anticoagulação do HRTN foi inaugurada em março de 2011 e realiza acompanhamento para controle da coagulação de pacientes com histórico de trombose e AVC. A instituição atende pacientes do eixo norte da região metropolitana de Belo Horizonte (incluindo Venda Nova). A URS Sagrada Família é administrada pela prefeitura de Belo Horizonte. A clínica de anticoagulação foi implantada em agosto de 2011 e atende pacientes das regiões nordeste e leste da cidade (**Figura 2**). Todas as clínicas contam com equipes multidisciplinares incluindo médicos, enfermeiros e farmacêuticos. Suas atribuições envolvem atividades focadas na efetividade e segurança da terapia anticoagulante por meio da adoção de protocolos e diretrizes clínicas com padronização da monitorização da RNI, reações adversas, interações medicamentosas e dietéticas, ajustes de dose da varfarina e atividades de educação em saúde. Tudo isso contribui para qualidade na

estruturação dos serviços independentemente de suas diferenças de infraestrutura e pessoal.

Os processos de extração e genotipagem do DNA foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Esse laboratório dispõe da infraestrutura necessária para o desenvolvimento dessa etapa, contando com equipe treinada e experiência consolidada em Biologia Molecular.

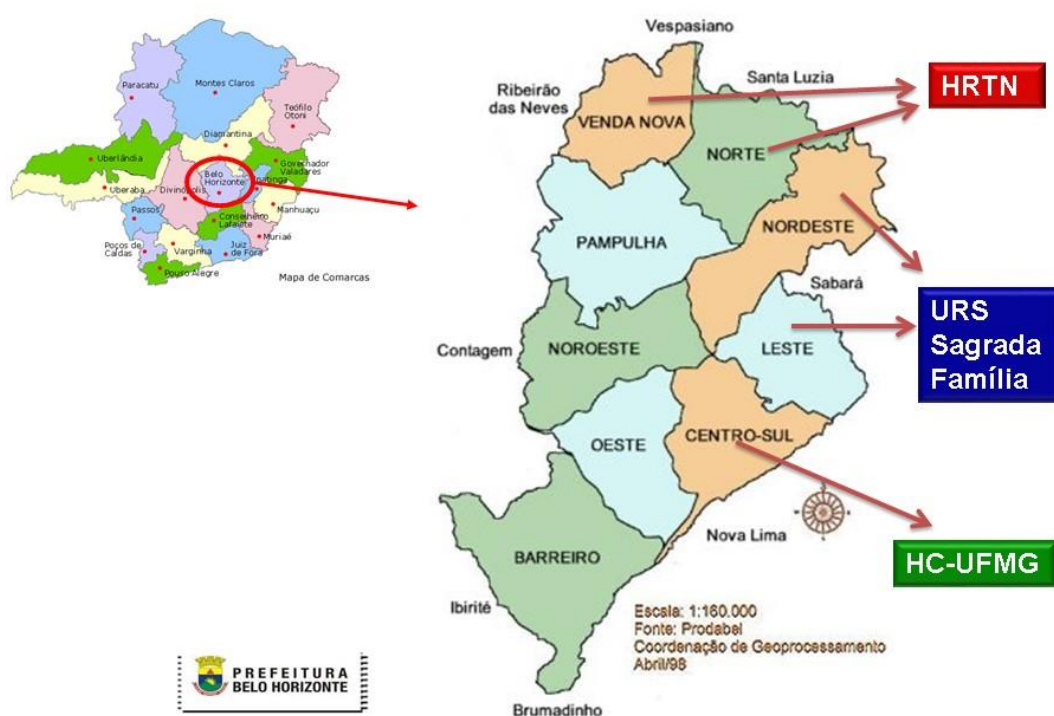


Figura 2 - Mapa da cidade de Belo Horizonte e indicação das regiões da cidade atendidas pelas clínicas de anticoagulação participantes do estudo. (Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/montapagina.php?pagina=distritos/index.html>)

(HC-UFMG, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária)

## 5.4 Participantes

### 5.4.1 CrITÉRIOS de inclusÃO, nÃO-inclusÃO e exclusÃO

Foram incluídos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, regularmente acompanhados nas clínicas de anticoagulação, que no início do recrutamento estavam utilizando varfarina por tempo igual ou superior a dois meses, e com pelo menos uma indicação para uso de varfarina. Dentre as indicações, considerou-se: FA/flutter, prótese mecânica de válvula cardíaca, histórico de TVP, tromboembolismo pulmonar (TEP), trombo intracardíaco, acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) ou ataque isquêmico transitório (AIT).

Não foram incluídos pacientes com indicação de uso da varfarina por tempo inferior a um ano. Além disso, pacientes recrutados que não compareceram para coleta de sangue foram excluídos.

### 5.4.2 Seleção dos pacientes e cálculo amostral

O banco de dados deste estudo continha informações de 801 pacientes no total. Oitenta e um pacientes foram excluídos porque não compareceram à coleta de sangue, restando 720 pacientes elegíveis. Para seleção dos pacientes de nosso estudo, realizou-se um cálculo amostral em duas etapas que utilizou informações sobre as frequências alélicas e as doses de acordo com o genótipo.

Primeiramente, o cálculo amostral baseou-se nas frequências dos alelos variantes de cada gene estudado [alelo A para *VKORC1* (31,20%), alelo \*3 para *CYP2C9* (5,00%), alelo T para *MDR1* (39,25%) e  $\epsilon$ 4 para *APOE* (14,24%)], obtidas a partir de estudo piloto realizado com pacientes do HC-UFGM (MOURÃO, 2017). Os tamanhos de amostra calculados foram 237, 264, 256 e 194 pacientes, respectivamente. Optou-se pela amostra de 264 pacientes que correspondeu ao maior valor encontrado e para o qual foi utilizado 90% de poder estatístico e precisão de 0,10 na estimativa da proporção do alelo variante para o gene *CYP2C9*. O teste utilizado foi o Teste Z para estimativa de uma proporção a um nível de significância de 0,05 e o software *Minitab 14 Release*.



Posteriormente, levou-se em consideração as estratificações de doses para cada genótipo possível dentro de cada gene, também obtidas a partir de estudo piloto. O maior valor encontrado foi para *MDR1* em que um tamanho amostral de pelo menos 315 pacientes seria necessário para obter 90% de poder estatístico na detecção de uma diferença mínima de 5,0mg/semana entre as doses dos três tipos de genótipos (CC; CT; TT) daquele gene. Considerou-se nos cálculos um valor de desvio padrão de 17,60 (estudo piloto). Utilizou-se o *Teste ANOVA one-way* e o software *Minitab 14 Release*. Para seleção do valor de 5,0mg/semana, considerou-se a mediana de doses semanais dos 720 pacientes elegíveis obtendo-se um valor aproximado de 26,2mg. Na literatura, uma diferença de dose considerada clinicamente relevante representa  $\pm 20\%$  do valor da dose (RAMOS *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012). Nesse caso, 20% de 26,2mg são, aproximadamente, 5,2mg cujo valor serviu de referência para arredondar e obter o valor final de 5,0mg utilizado no estudo.

Como observado, no segundo cálculo obteve-se um tamanho de amostra maior, o que supriu a necessidade amostral de todos os outros genes. O valor de 315 pacientes, portanto, foi escolhido. Os pacientes do estudo piloto também participaram do estudo principal.

#### **5.4.2.1 Distribuição dos pacientes nos três centros**

Dos 720 pacientes elegíveis, 312 (43,3%) foram recrutados no HC-UFMG (MOURÃO, 2017), 221 (30,7%) no HRTN e 187 (26,0%) no URS Sagrada Família. Com base nesses valores proporcionais, os 315 pacientes foram distribuídos entre os centros alocando-se 136 pacientes no HC-UFMG, 97 no HRTN e 82 no URS Sagrada Família (**Figura 3**). Para seleção dos pacientes em cada centro, foi realizado um sorteio puro e simples utilizando o programa estatístico R (versão 3.4.3). Portanto, foi realizada uma amostragem complexa em dois níveis cujo primeiro nível foi uma amostragem estratificada por centro e em segundo nível uma amostragem aleatória simples.

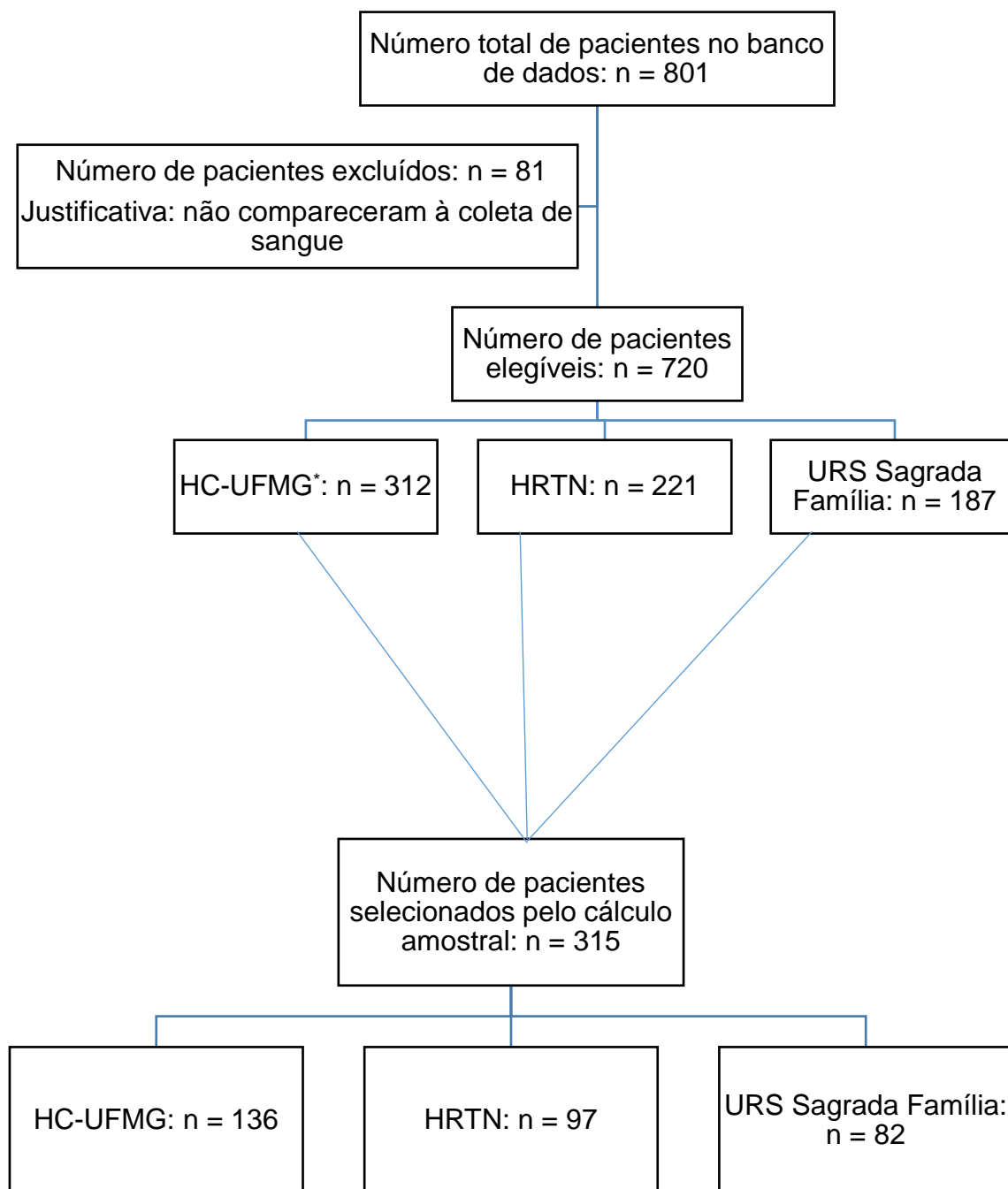


Figura 3 - Fluxograma representativo da seleção do grupo amostral. (HC-UFMG, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária).

\*MOURÃO, 2017.

## **5.5 Coleta de dados**

A coleta dos dados sociodemográficos, comportamentais, clínicos e farmacoterapêuticos foi realizada por meio de entrevistas e aplicação de questionários aos pacientes no momento do recrutamento. As informações obtidas foram complementadas após consulta aos prontuários e prescrições médicas. Essa etapa foi realizada por três farmacêuticos pós-graduandos e duas estudantes de farmácia. A equipe foi devidamente treinada para a finalidade da coleta. Os resultados de RNI e as doses de manutenção semanais foram recuperados nos bancos de dados informatizados dos três centros. Foi requisitada a coleta de um tubo contendo 10mL de sangue de cada paciente para fins de genotipagem.

O período compreendido entre o início e o término do recrutamento dos pacientes e coleta dos dados foi o seguinte para cada clínica:

- HC-UFMG: fevereiro/2015 a dezembro/2015;
- HRTN: outubro/2014 a fevereiro/2015;
- URS Sagrada Família: julho/2015 a dezembro/2015.

### **5.5.1 Variáveis**

#### **5.5.1.1 Variável dependente**

Considerou-se como variável resposta a dose de manutenção semanal média de varfarina (mg/semana). Para o cálculo, somou-se as doses de manutenção semanais de cada paciente e dividiu-se pelo número de semanas referentes ao período total de seguimento compreendido entre os anos de 2011 e 2015 de cada paciente. Escolheu-se trabalhar com a dose de manutenção semanal média de varfarina visto que é uma dose mais estável e que sofre menos flutuações. Já um paciente que está no início do tratamento com varfarina tende a ter maiores variações na dose semanal e maior número de ajustes de dose também. As três clínicas de anticoagulação apresentam protocolos padronizados para realizar ajustes de dose que são baseados na dose semanal de cada paciente.

### 5.5.1.2 Variáveis independentes

As seguintes variáveis explicativas foram estudadas:

- Sociodemográficas: idade (anos), sexo, grau de escolaridade, renda mensal *per capita* (dólares americanos);
- Comportamentais: necessidade de auxílio para administração de varfarina, tabagismo (definido como uso de pelo menos um cigarro no último mês) (NCEP, 2002) e consumo de álcool (consumo excessivo de álcool foi definido como consumo diário de mais que 60g de etanol, correspondente a aproximadamente quatro doses, nos últimos seis meses. Uma dose equivale à ingestão de 340mL de cerveja contendo 5% de etanol ou 43mL de bebidas destiladas contendo 40% de etanol, por exemplo) (SKINNER *et al.*, 1984);
- Clínicas e relacionadas ao atendimento: clínica de anticoagulação, indicação de uso da varfarina, faixa terapêutica da RNI (2,00-3,00; 2,50-3,50), TTR (%), número de comorbidades, tipos de comorbidades;
- Farmacoterapêuticas: tempo de tratamento com varfarina, número de medicamentos utilizados continuamente por mais de 30 dias incluindo a varfarina, uso de ácido acetilsalicílico, amiodarona, carbamazepina, fenitoína, sinvastatina;
- Genóticas: genótipos para *CYP2C9* (alelos \*1, \*2 e \*3), para *VKORC1* (-1639 G>A), *MDR1* (3435 C>T) e para *APOE* ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4).

O TTR foi calculado pelo método proposto por Rosendaal (ROSENDAAL *et al.*, 1993) considerando o maior número de valores da RNI dentro do período máximo de seguimento de cada paciente (2011 a 2015). O resultado do TTR é apresentado na forma de porcentagem e assume-se uma relação linear entre dois valores consecutivos da RNI (ROSENDAAL *et al.*, 1993). Para pacientes que apresentaram intervalos maiores que 56 dias entre valores da RNI, foi realizada uma média aritmética ponderada entre esse conjunto de valores da RNI, sendo o resultado dessa média considerado como o valor de TTR final daqueles pacientes (RAZOUKI *et al.*, 2014). Um valor de TTR acima de 60,0% foi considerado adequado, indicando boa qualidade da terapia anticoagulante (CONNOLLY *et al.*, 2008).

### 5.5.2 Genotipagem

A genotipagem dos polimorfismos consistiu em duas etapas: extração do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR, do inglês, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Para extração, foram coletados 10mL de sangue em EDTA, sendo o DNA extraído pelo método de precipitação alcoólica, utilizando kit Biopur® (Biometrix), seguindo instruções do fabricante.

Os genótipos para *CYP2C9*\*2 (rs1799853, C\_\_25625805\_10); *CYP2C9*\*3 (rs1057910, C\_\_27104892\_10), para *VKORC1* (rs9923231, C\_\_30403261\_20), *MDR1* (rs1045642, C\_\_7586657\_20) e para *APOE* (rs429358, C\_\_3084793\_20; rs7412, C\_\_904973\_10) foram determinados pelo método de qPCR em equipamento *QuantStudio 3* (*Applied Biosystems*), utilizando-se sonda para discriminação alélica TaqMan® (*Applied Biosystems*). Em todas as reações, utilizou-se um branco (tubo sem amostra) e três controles para cada gene (amostras com genótipos conhecidos): *CYP2C9* (\*1/\*1; \*1/\*2; \*1/\*3), *VKORC1* (GG; GA; AA), *MDR1* (CC; CT; TT), e *APOE* ( $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3;  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3;  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4). Cumpre ressaltar que os genótipos para *CYP2C9* e *VKORC1* nos pacientes do HC-UFGM já tinham sido determinados em estudo anterior (MOURÃO, 2017).

Utilizou-se protocolo de qPCR padronizado em trabalho prévio (MOURÃO, 2017) para genotipagem de *CYP2C9* e *VKORC1* (**Quadros 1 e 2**).

Quadro 1 - Protocolo de reagentes para qPCR utilizado na determinação dos genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1*.

Reagentes	$\mu$ L
<i>Genotyping Master Mix</i>	5,0
Água deionizada	2,5
<i>TaqMan SNP Genotyping assay</i>	0,5
DNA genômico	1,0 (10 a 50 ng/ $\mu$ L)

(MOURÃO, 2017)

Quadro 2 - Programa utilizado na amplificação para discriminação alélica dos polimorfismos de *CYP2C9* e *VKORC1*.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclagem
1	60°C	30 segundos	1 ciclo
2	95°C	10 minutos	1 ciclo
3	95°C	10 segundos	60 ciclos
	60°C	1 minuto	
4	60°C	30 segundos	1 ciclo

(MOURÃO, 2017)

Os protocolos utilizados para genotipagem dos polimorfismos de *MDR1* e *APOE* se encontram descritos nos **Quadros 3 e 4**.

Quadro 3 - Protocolo de reagentes para qPCR utilizado na determinação dos genótipos de *MDR1* e *APOE*.

Reagentes	µL
<i>Genotyping Master Mix</i>	5,0
Água deionizada	2,5
<i>TaqMan SNP Genotyping assay</i>	0,6
DNA genômico	2,0

Quadro 4 - Programa utilizado na amplificação para discriminação alélica dos polimorfismos de *MDR1* e *APOE*.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclagem
1	60°C	30 segundos	1 ciclo
2	95°C	10 minutos	1 ciclo
	95°C	15 segundos	
3			45 ciclos
4	60°C	1 minuto	1 ciclo
	60°C	30 segundos	

## 5.6 Análise estatística

Os bancos de dados foram construídos e validados por dupla digitação no programa EpiData (versão 3.1; EpiData Assoc, Odense M, Denmark). Os dados foram transferidos para o programa SPSS (IBM SPSS Statistics 25.0) e, em seguida, para planilha única no Microsoft Excel. A análise dos dados foi realizada no programa estatístico R (versão 3.3.4).

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na análise descritiva dos dados, para as variáveis categóricas foram utilizadas medidas de frequência absoluta e relativa. Para as variáveis contínuas foram utilizadas medidas de tendência central (média) e variabilidade (desvio padrão). Utilizou-se análise de variância para comparar as médias de variáveis contínuas e inteiras entre os três centros. A existência de associação entre os locais de coleta e variáveis categóricas foi avaliada através de teste Qui-quadrado com valor p obtido por 2000 simulações. Para comparar as frequências alélicas entre as três clínicas de anticoagulação, utilizou-se teste para igualdade de proporções (Qui-quadrado). Enquanto o teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças de dose entre os genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1*. Para verificação de interação gênica foi utilizada análise de variância com dois fatores.

Na análise univariada, a dose de manutenção semanal média de varfarina foi confrontada com todas as variáveis genéticas e não genéticas descritas. Para as variáveis genéticas, realizou-se a análise com base em cinco modelos genéticos: codominância, dominância, recessivo, sobredominância e log-aditivo. Para as variáveis não genéticas, caso a variável fosse categórica dicotômica, foi realizado o teste t. Em caso de variáveis categóricas politômicas (com até 10 categorias), foi realizado teste de análise de variância. E para as variáveis não genéticas contínuas, a associação com a dose de varfarina foi verificada através do coeficiente de correlação de Pearson.

As variáveis que alcançaram um nível de significância menor que 0,20 na análise univariada foram consideradas aptas para o modelo final. Entretanto, apenas as variáveis com  $p < 0,05$  permaneceram no modelo multivariado. Foi construído modelo de regressão gama com função de ligação logarítmica.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo. O texto foi formatado seguindo as instruções aos autores do periódico *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (ISSN 1742-7843).



### **6.1 Artigo: Influência de polimorfismos nos genes CYP2C9, VKORC1, MDR1 e APOE e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação no Brasil**

Emílio Itamar de Freitas Campos, RPh, MSc<sup>1</sup>, Karina Braga Gomes, RPh, PhD<sup>2</sup>, Daniel Dias Ribeiro, MD, PhD<sup>3</sup>, Marja Kaarina Puurunen, MD, PhD<sup>4</sup>, Aline de Oliveira Magalhães Mourão, RPh, PhD<sup>1</sup>, Isadora Gonçalves Ferreira, RPh<sup>2</sup>, Manoel Otávio da Costa Rocha, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Renan Pedra de Souza, BStat, PhD<sup>5</sup>, Maria Auxiliadora Parreiras Martins, RPh, PhD<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 110, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brasil.

<sup>4</sup>Boston University, Framingham Heart Study, 73 Mount Wayte Avenue, Suite 2 Framingham, Massachusetts 01702, USA.

<sup>5</sup>Grupo de Pesquisa em Bioestatística e Epidemiologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brasil.

Autor para correspondência: Maria Auxiliadora Parreiras Martins, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brasil. E-mail: auxiliadorapmartins@hotmail.com

Título resumido: Polimorfismos genéticos e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de varfarina.

Palavras-chave: varfarina, CYP2C9, VKORC1, MDR1, APOE.

Resumo: A varfarina é um anticoagulante oral utilizado para tratar e prevenir o tromboembolismo. Na prática clínica, existe uma ampla variação na dose-resposta à varfarina. Há evidências de que polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* podem influenciar na dose de varfarina. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de fatores sociodemográficos, clínicos e dos polimorfismos \*1, \*2 e \*3 para o gene *CYP2C9*, -1639 G>A para o gene *VKORC1*, 3435 C>T para *MDR1* e  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4 para *APOE* na dose de manutenção semanal média de varfarina. Trata-se de estudo transversal, conduzido em três clínicas de anticoagulação localizadas na região sudeste do Brasil. Foi construído um modelo de regressão gama com função de ligação logarítmica contendo as variáveis significativamente associadas à dose de varfarina. Uma amostra calculada de 315 pacientes foi incluída no estudo. A média de idade foi de 64,1±13,1 anos, e 173 (54,9%) pacientes eram do sexo feminino. A principal indicação de uso para varfarina foi fibrilação atrial/flutter (n=240; 76,2%). O modelo de regressão revelou que idade, uso de amiodarona, genótipo *VKORC1* GA, genótipo *VKORC1* AA, genótipos *CYP2C9*\*1/\*2 ou \*1/\*3 e genótipos *CYP2C9*\*2/\*2 ou \*2/\*3 ou \*3/\*3 estavam associados com redução na dose de varfarina. Esses resultados sugerem que fatores sociodemográficos, farmacoterápicos e genéticos influenciam na terapia com varfarina. Em conjunto, essas informações permitem obter melhor conhecimento da nossa população, e assim contribuem para subsidiar melhorias no processo de cuidado ao paciente.

## INTRODUÇÃO

A varfarina é o anticoagulante oral mais amplamente utilizado em pacientes com fatores de risco para distúrbios tromboembólicos [1-3]. Devido ao seu estreito índice terapêutico e a interações com grande número de medicamentos, a terapia com varfarina precisa ser monitorizada [4-6]. A monitorização é feita por meio da determinação da Relação Normalizada Internacional (RNI), que auxilia nos ajustes de dose [2,7,8].

Na prática clínica existe ampla variação na dose-resposta à varfarina [1,9,10]. Essa variação é explicada por fatores sociodemográficos, clínicos, farmacoterapêuticos e genéticos [6,9,11]. Polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1* são os principais determinantes genéticos dos requerimentos de dose [1,12]. Entretanto, outros genes também têm sido estudados. Estudos apontam que polimorfismos nos genes *MDR1* e *APOE* são possíveis interferentes na dose de varfarina [1,13,14].

O gene *CYP2C9* expressa a enzima que metaboliza a varfarina [12], enquanto *VKORC1* dá origem à enzima alvo da varfarina (a vitamina K epóxido redutase) [12,15]. Os alelos polimórficos *CYP2C9*\*2 (rs1799853) e *CYP2C9*\*3 (rs1057910) no gene *CYP2C9* e o polimorfismo -1639 G>A (rs9923231) em *VKORC1* levam à redução da necessidade de dose de varfarina [2, 4, 12, 15, 16]. Por outro lado, o alelo *APOE* ε4 (rs429358; rs7412) e o polimorfismo 3435 C>T (rs1045642) no gene *MDR1* têm sido associados a elevadas doses do anticoagulante [13,14,17,18]. *APOE* está envolvido com a captação hepática de vitamina K [13], enquanto *MDR1* com a absorção intestinal e eliminação hepática da varfarina [17]. No entanto, os resultados para *MDR1* e *APOE* na literatura são controversos [1,13,17,19].

Fatores sociodemográficos e clínicos podem explicar até 50,0% da variabilidade na dose de varfarina [2]. Idade, sexo, peso corporal, ingestão de alimentos ricos em vitamina K, interações medicamentosas, comorbidades, consumo de álcool e tabagismo são alguns dos fatores sociodemográficos e clínicos associados à dose de varfarina [6,9,15]. No geral, sexo feminino está associado ao uso de doses menores, enquanto doses maiores são requeridas por pacientes com elevada ingestão de vitamina K. Além disso, pacientes idosos

utilizam doses menores que pacientes mais jovens [19]. O consumo crônico de álcool pode levar ao aumento no *clearance* da varfarina [15].

Nesse contexto, este estudo objetivou investigar a influência de fatores sociodemográficos, clínicos e dos polimorfismos \*1, \*2 e \*3 para o gene *CYP2C9*, -1639 G>A para o gene *VKORC1*, 3435 C>T de *MDR1* e  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4 para *APOE* na dose de manutenção semanal média de varfarina em pacientes recrutados em três clínicas de anticoagulação em Belo Horizonte (estado de Minas Gerais – Brasil).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

*Desenho e local do estudo.* Trata-se de um estudo observacional do tipo transversal desenvolvido em três clínicas de anticoagulação de referência no sistema público de saúde da cidade de Belo Horizonte, região sudeste do Brasil. Os três centros contam com equipes multidisciplinares incluindo médicos, enfermeiros e farmacêuticos. Suas atribuições envolvem atividades focadas na efetividade e segurança da terapia anticoagulante por meio da adoção de protocolos e diretrizes clínicas com padronização dos ajustes de dose. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE 08136613.4.0000.5149). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

*População do estudo.* Os pacientes foram recrutados entre outubro de 2014 e dezembro de 2015. Foram incluídos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, que no início do recrutamento estavam utilizando varfarina por tempo igual ou superior a dois meses, e com pelo menos uma indicação para uso de varfarina. Dentre as indicações, considerou-se: fibrilação atrial/flutter, prótese mecânica de válvula cardíaca, histórico de trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, trombo intracardíaco, acidente vascular cerebral isquêmico ou ataque isquêmico transitório. Aqueles pacientes que não compareceram para coleta de sangue foram excluídos.

A seleção do número de pacientes foi realizada por meio de cálculo amostral utilizando o programa estatístico Minitab (*Inc. Statistical Software Data Analysis Software. Version 14*). Levou-se em consideração as estratificações de doses para cada genótipo possível dentro de cada gene, obtidas a partir de estudo

piloto realizado com pacientes do centro 1. O maior tamanho amostral encontrado foi para *MDR1* em que pelo menos 315 pacientes seria necessário para obter 90% de poder estatístico na detecção de uma diferença mínima de 5,0mg/semana entre as doses dos três tipos de genótipos (CC; CT; TT) daquele gene. Considerou-se nos cálculos um valor de desvio padrão de 17,60 (estudo piloto). Utilizou-se o *Teste ANOVA one-way*. Para seleção do valor de 5,0mg/semana, considerou-se a mediana de doses semanais dos 720 pacientes elegíveis do nosso banco de dados (81 pacientes já tinham sido excluídos porque não compareceram à coleta de sangue), obtendo-se um valor aproximado de 26,2mg. Na literatura, uma diferença de dose considerada clinicamente relevante representa  $\pm 20\%$  do valor da dose [20,21], o que resultou no valor aproximado de 5,0mg/semana.

Dos 720 pacientes elegíveis, 312 (43,3%) foram recrutados no centro 1 [22], 221 (30,7%) no centro 2 e 187 (26,0%) no centro 3. Para alocação dos 315 pacientes, realizamos uma amostragem complexa em dois níveis cujo primeiro nível foi uma amostragem estratificada por centro e em segundo nível uma amostragem aleatória simples realizada no programa estatístico R (versão 3.4.3). Os 315 pacientes foram distribuídos entre os centros alocando-se proporcionalmente 136 pacientes no centro 1, 97 no centro 2 e 82 no centro 3 (**Figura 1**).

*Coleta de dados.* A coleta dos dados foi realizada por meio de entrevistas e aplicação de questionários aos pacientes. As informações obtidas foram complementadas após consulta aos prontuários e prescrições médicas. Os resultados de RNI e as doses de manutenção semanais foram recuperados nos bancos de dados informatizados dos três centros. Foi requisitada a coleta de um tubo contendo 10mL de sangue de cada paciente para fins de genotipagem.

Os seguintes dados foram coletados: idade (anos), sexo, grau de escolaridade, renda mensal *per capita* (dólares americanos), necessidade de auxílio para administração de varfarina, tabagismo (definido como uso de pelo menos um cigarro no último mês) [23], consumo excessivo de álcool (definido como consumo diário de mais que 60g de etanol) [24], clínica de anticoagulação, indicação de uso da varfarina, faixa terapêutica da RNI (2,00-3,00; 2,50-3,50), TTR (*time in therapeutic range*) (%), número de comorbidades, tipos de

comorbidades, tempo de tratamento com varfarina (anos), número de medicamentos em uso crônico ( $\geq 30$  dias) incluindo a varfarina, uso de ácido acetilsalicílico, amiodarona, carbamazepina, fenitoína, sinvastatina. Esses medicamentos foram selecionados com base em estudos prévios [1,7,8,16].

O TTR foi calculado pelo método de interpolação linear proposto por Rosendaal [25] considerando o maior número de valores da RNI dentro do período máximo de seguimento de cada paciente (2011 a 2015). Valor de TTR acima de 60,0% foi considerado adequado, indicando boa qualidade da terapia anticoagulante [26]. Para o cálculo da dose, somou-se as doses de manutenção semanais de cada paciente e dividiu-se pelo número de semanas referentes ao período total de seguimento compreendido entre os anos de 2011 e 2015 de cada paciente. Escolhemos trabalhar com a dose de manutenção semanal média de varfarina visto que é uma dose mais estável e que sofre menos flutuações.

*Genotipagem.* Para extração do DNA, foram coletados 10mL de sangue em EDTA, sendo o DNA extraído com o kit Biopur<sup>®</sup> (Biometrix), seguindo instruções do fabricante. Os genótipos para CYP2C9\*2 (rs1799853, C\_\_25625805\_10); CYP2C9\*3 (rs1057910, C\_\_27104892\_10), VKORC1 (rs9923231, C\_\_30403261\_20), MDR1 (rs1045642, C\_\_7586657\_20) e APOE (rs429358, C\_\_3084793\_20; rs7412, C\_\_904973\_10) foram determinados pelo método de qPCR em equipamento *QuantStudio 3 (Applied Biosystems)*, utilizando-se sonda para discriminação alélica TaqMan<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

*Análise estatística.* Os bancos de dados foram construídos e validados por dupla digitação no programa EpiData (versão 3.1; EpiData Assoc, Odense M, Denmark). Os dados foram transferidos para o programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS para Windows, ver 25.0; SPSS, Chicago, IL)* e, em seguida, para planilha única no Microsoft Excel. A análise dos dados foi realizada no programa estatístico R (versão 3.3.4).

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na análise descritiva dos dados, para as variáveis categóricas foram utilizadas medidas de frequência absoluta e relativa. Para as variáveis contínuas

foram utilizadas medidas de tendência central (média) e variabilidade (desvio padrão). Utilizou-se análise de variância para comparar as médias de variáveis contínuas e inteiras entre os três centros. A existência de associação entre os locais de coleta e variáveis categóricas foi avaliada através de teste Qui-quadrado com valor  $p$  obtido por 2000 simulações. Para comparar as frequências alélicas entre as três clínicas de anticoagulação, utilizou-se teste para igualdade de proporções (Qui-quadrado). Enquanto o teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças de dose entre os genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1*. Para verificação de interação gênica foi utilizada análise de variância com dois fatores.

Na análise univariada, a dose de manutenção semanal média de varfarina foi confrontada com todas as variáveis genéticas e não genéticas descritas. Para as variáveis genéticas, realizou-se a análise com base em cinco modelos genéticos: codominância, dominância, recessivo, sobredominância e log-aditivo. Para as variáveis não genéticas, caso a variável fosse categórica dicotômica, foi realizado o teste  $t$ . Em caso de variáveis categóricas politômicas (com até 10 categorias), foi realizado teste de análise de variância. E para as variáveis não genéticas contínuas, a associação com a dose de varfarina foi verificada através do coeficiente de correlação de Pearson.

As variáveis que alcançaram um nível de significância menor que 0,20 na análise univariada foram consideradas aptas para o modelo final. Entretanto, apenas as variáveis com  $p < 0,05$  permaneceram no modelo. Foi construído modelo de regressão com função de ligação logarítmica.

## RESULTADOS

Foram incluídos 315 pacientes no estudo, sendo 136 pacientes no centro 1, 97 pacientes no centro 2 e 82 pacientes no centro 3. A média de idade foi de  $64,1 \pm 13,1$  anos. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (173 pacientes; 54,9%), com renda mensal média de  $227,50 \pm 179,95$  dólares. A principal indicação de uso de varfarina foi fibrilação atrial/flutter (240 pacientes; 76,2%), e a principal comorbidade observada foi hipertensão (241 pacientes; 76,5%). A dose de manutenção semanal média dos pacientes foi  $28,5 \pm 13,1$  mg (valor mínimo de 5,9 mg/semana e valor máximo de 87,0 mg/semana). O TTR médio foi  $65,5 \pm 17,9\%$ . Duzentos e quinze (68,3%) pacientes apresentaram TTR acima de

60,0%. As características dos pacientes do estudo total e em cada centro estão descritas na **Tabela 1**.

As variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre centros foram idade, renda mensal, necessidade de auxílio para administração de varfarina, consumo de álcool, indicações de uso de varfarina, faixa terapêutica da RNI, tempo de tratamento com varfarina, dose de manutenção semanal média, número de comorbidades e tipos de comorbidades. Dentre os medicamentos com potencial de interação com a varfarina, apenas ácido acetilsalicílico diferiu significativamente entre as clínicas (**Tabela 1**).

Todos os 315 pacientes foram genotipados para os quatro genes estudados. O genótipo  $CYP2C9^{*1}/^{*1}$  foi encontrado em 222 (70,5%) pacientes e pelo menos um alelo variante ( $CYP2C9^{*2}$  ou  $^{*3}$ ) estava presente em 29,5% dos pacientes. Para o gene *VKORC1*, os genótipos mais comuns foram GG e GA com frequências de 47,9% e 39,7%, respectivamente. O genótipo heterozigoto para *MDR1* foi encontrado em 144 (45,7%) pacientes e apenas 46 (14,6%) pacientes eram homozigotos para o alelo variante T. O genótipo mais frequente para o gene *APOE* foi o  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (62,9%), seguido pelo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (22,5%). Apenas nove (2,9%) pacientes foram classificados como *APOE*  $\epsilon 4/\epsilon 4$ . Não foi observada diferença significativa entre as frequências dos alelos e dos genótipos dos quatro genes nas três clínicas de anticoagulação. Os polimorfismos de *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* não mostraram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ) tanto na amostra completa (315 pacientes) quanto nos centros individualmente. As frequências alélicas e genotípicas para os quatro genes do estudo estão descritas na **Tabela 2**.

Pacientes com genótipo  $CYP2C9^{*1}/^{*1}$  utilizavam dose média de varfarina maior que indivíduos carreadores de uma cópia dos alelos variantes (genótipos  $CYP2C9^{*1}/^{*2}$  ou  $^{*1}/^{*3}$ ) (31,2mg/semana vs. 22,4mg/semana,  $p < 0,001$ ), e também maior que pacientes com duas cópias dos polimorfismos (genótipos  $CYP2C9^{*2}/^{*2}$  ou  $^{*2}/^{*3}$  ou  $^{*3}/^{*3}$ ) (31,2mg/semana vs. 15,5mg/semana,  $p < 0,001$ ). Entretanto, não foi detectada diferença significativa entre as doses semanais médias de pacientes com uma e duas cópias dos alelos variantes (22,4mg/semana vs. 15,5mg/semana,  $p = 0,247$ ) (**Tabela 3**).



A presença de um ou dois alelos variantes em *VKORC1* levou à redução da dose média de varfarina. Pacientes com genótipo *VKORC1* AA tiveram, em média, redução de 16,3mg [intervalo de confiança (IC) 95% -20,5 a -12,1] na dose semanal de varfarina em relação a pacientes com genótipo *VKORC1* GG. Enquanto pacientes com genótipo *VKORC1* GA tiveram dose intermediária entre aqueles dois genótipos [33,5mg/semana (GG) vs. 25,8mg/semana (GA) vs. 17,2mg/semana (AA),  $p < 0,001$ ]. Tanto para *VKORC1* quanto para *CYP2C9*, o efeito de redução na dose foi maior nos genótipos que apresentavam dois alelos polimórficos em relação aos que apresentavam um ou nenhum alelo variante (demonstrado pelo modelo log-aditivo) (**Tabela 3**). As associações de *CYP2C9* e *VKORC1* com a dose de varfarina também foram observadas em cada clínica de anticoagulação individualmente. Entretanto, não foi detectada qualquer tipo de interação entre esses dois genes ( $p = 0,209$ ).

Para o gene *MDR1*, o único modelo genético que resultou em associação significativa com a dose de manutenção semanal média de varfarina foi o modelo de dominância [CC vs. (CT + TT)]. A presença de pelo menos um alelo variante T levou à redução da dose média de varfarina (30,3mg/semana vs. 27,3mg/semana;  $p = 0,045$ ) na amostra de 315 pacientes. No entanto, quando se avaliou esse modelo em cada centro individualmente, os polimorfismos não mostraram qualquer associação com a dose média de varfarina ( $p > 0,05$ ). Não se detectou associação entre os polimorfismos no gene *APOE* e a dose semanal média de varfarina ( $p = 0,761$ ). (**Tabela 3**).

Na análise univariada, as variáveis não genéticas que resultaram em valor  $p < 0,20$  foram idade (anos), idade categórica, grau de escolaridade, necessidade de auxílio para administração de varfarina, clínica de anticoagulação, indicação de uso da varfarina, faixa terapêutica da RNI, TTR (%), número de comorbidades, tipos de comorbidades, número de medicamentos em uso crônico, uso de ácido acetilsalicílico, amiodarona e sinvastatina (**Tabelas 4 e 5**). Um modelo de regressão gama com função de ligação logarítmica foi desenvolvido utilizando as variáveis selecionadas na análise univariada ( $p < 0,20$ ). As variáveis com  $p < 0,05$  foram incorporadas ao modelo final. Os resultados evidenciaram que idade, uso de amiodarona, genótipo *VKORC1* GA, genótipo *VKORC1* AA, genótipos *CYP2C9*\*1/\*2 ou \*1/\*3 e genótipos

CYP2C9\*2/\*2 ou \*2/\*3 ou \*3/\*3 estavam associados com redução na dose de varfarina. Nenhuma das variáveis incluídas no modelo foi associada com aumento da necessidade de dose. Os resultados do modelo de regressão estão descritos na **Tabela 6**.

De acordo com o modelo de regressão, o aumento de dez anos na idade reduz a dose semanal média de varfarina em 10,97%. Um paciente que faz uso de amiodarona utiliza dose de manutenção semanal média de varfarina 17,81% menor que um paciente que não utiliza esse medicamento. Com relação aos genótipos, um paciente heterozigoto VKORC1 GA ou com genótipo VKORC1 AA utiliza dose semanal, em média, 23,05% e 47,30% menor, respectivamente, em relação a um paciente com genótipo VKORC1 GG. Enquanto um paciente com apenas um alelo variante (genótipos CYP2C9\*1/\*2 ou \*1/\*3) ou dois alelos variantes (genótipos CYP2C9\*2/\*2, \*2/\*3 ou \*3/\*3) para CYP2C9 utiliza dose semanal média de varfarina 20,63% e 52,63% menor, respectivamente, que pacientes com genótipo CYP2C9\*1/\*1 (**Tabela 6**).

## **DISCUSSÃO**

Este estudo objetivou investigar a associação de fatores sociodemográficos, clínicos e de polimorfismos nos genes *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* com a dose de manutenção semanal média de varfarina em pacientes brasileiros. Apenas alelos variantes nos genes *CYP2C9* e *VKORC1* mostraram associação com a dose de varfarina. Redução na dose é esperada em pacientes com uma ou duas cópias dos alelos CYP2C9\*2 ou \*3 e VKORC1 -1639 A. O modelo de regressão gama construído para essa população demonstrou que além de *CYP2C9* e *VKORC1*, idade e uso de amiodarona também estavam associadas com redução na dose de varfarina.

A análise dos dados mostrou que o centro em que o paciente era acompanhado foi um fator associado à dose de varfarina, havendo ainda uma relação inversa entre dose e idade. As doses semanais médias de varfarina nos centros 1, 2 e 3 foram 30,5mg/semana, 27,9mg/semana e 25,7mg/semana, respectivamente ( $p=0,027$ ), ao passo que as médias de idade dos pacientes nesses centros foram, respectivamente, 60,1, 65,9 e 68,6 anos ( $p<0,001$ ). Estudos na literatura apontam que a idade está associada à redução na dose de

varfarina [1,3,16,19], e pacientes mais idosos tendem a utilizar doses menores do fármaco. Embora, inicialmente, tenhamos encontrado associação entre a dose de varfarina e o centro ao qual o paciente estava sendo acompanhado, essa associação não se confirmou na análise multivariada.

A “necessidade de auxílio para administração de varfarina” mostrou diferença entre os centros com destaque para o centro 2 (21,6%). Nesse centro houve maior número médio de comorbidades ( $4,8 \pm 2,0$ ) e maior proporção de pacientes com as cinco comorbidades mais frequentes entre os pacientes do estudo (hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca, dislipidemia, doenças valvares, doenças respiratórias), sugerindo maior vulnerabilidade desses indivíduos e necessidade do envolvimento de cuidadores para auxílio na administração de varfarina.

O centro 1 apresentou maior proporção individual de pacientes com prótese mecânica geral (36,0%) entre os centros estudados o que pode ter contribuído para a maior proporção de pacientes com RNI alvo de 2,50-3,50 (27,2%) e também para a maior dose de manutenção média ( $30,5 \pm 15,2$ mg/semana). Esses achados sugerem consistência no manejo da dose de varfarina que representa um dos elementos fundamentais para o controle adequado da anticoagulação oral. O TTR médio dos pacientes do estudo foi 65,5%, e cada centro individualmente obteve média de TTR maior que 60,0% (64,3% no centro 1; 67,0% no centro 2; 65,6% no centro 3), demonstrando controle adequado da anticoagulação oral com varfarina nesses centros.

Em relação às variáveis genéticas, encontramos frequências de 83,8%, 11,0% e 5,2% para os alelos *CYP2C9*\*1, \*2 e \*3, respectivamente. Essas frequências foram semelhantes a encontradas por outros estudos também desenvolvidos no Brasil [1,8,16]. Detectamos associação entre polimorfismos em *CYP2C9* e a dose de manutenção de varfarina. Pacientes com um alelo *CYP2C9*\*2 ou \*3 utilizavam dose semanal média de varfarina 28,2% menor que pacientes homocigotos selvagens. A redução na dose (50,3%) foi ainda maior em pacientes com dois alelos variantes. Esses resultados corroboram com outros estudos no Brasil [1,8,16] e nas populações chinesa e norte americana [3,4,10] também. *CYP2C9* é a enzima responsável por metabolizar a S-varfarina. Pacientes *CYP2C9*\*1/\*1 são considerados metabolizadores normais. Enquanto

a presença de CYP2C9\*2 ou \*3 leva a expressão de enzimas com atividade reduzida, levando ao aumento na meia-vida da varfarina. Para adequada anticoagulação, pacientes com pelo menos uma cópia dos alelos variantes necessitam de doses menores de varfarina [3,4,15].

Na população do estudo, detectamos frequências de 67,8% para o alelo -1639G e 32,2% para o alelo -1639A de *VKORC1*. Botton *et al.* [16] encontraram frequências semelhantes [63,3% (G) e 36,7% (A)] em um estudo conduzido com pacientes da região sul do Brasil. Enquanto Almeida *et al.* [1] encontraram uma frequência de 75% para o alelo -1639G e 25% para o alelo -1639A em pacientes de uma clínica de anticoagulação localizada na região sudeste do Brasil. Interessantemente, Jiang *et al.* [3] detectaram uma frequência de 92,2% para o alelo -1639A de *VKORC1* em um estudo envolvendo pacientes chineses. Isso pode explicar porque pacientes asiáticos são mais sensíveis à varfarina que pacientes afro-americanos e caucasianos [12] e contribui para o entendimento do papel da etnia na frequência dos genótipos e alelos variantes em diversos genes [4].

Em nosso estudo, o polimorfismo *VKORC1* -1639 G>A mostrou associação com a dose de varfarina. Pacientes heterozigotos e homozigotos para o alelo variante -1639A utilizavam, em média, dose semanal 7,7mg e 16,3mg menor que pacientes homozigotos selvagens, respectivamente. Essa associação também foi observada por outros estudos descritos na literatura [1,3,4,8,10,16]. *VKORC1* é o gene que expressa a enzima alvo da varfarina, a vitamina K epóxido redutase. O polimorfismo *VKORC1* -1639 G>A na região promotora do gene, reduz a expressão da enzima alvo. Pacientes com uma ou duas cópias de -1639A necessitam de doses menores de varfarina do que pacientes homozigotos para -1639G [3,4,12].

Neste estudo, as frequências dos genótipos *MDR1* 3435CC, CT e TT foram 39,7%, 45,7% e 14,6%, respectivamente. Diferentemente, outro estudo também conduzido com pacientes brasileiros revelou frequências de 14,0%, 40,0% e 46,0% para esses mesmos genótipos, respectivamente [17]. Uma possível explicação para essa diferença seria que, no estudo de Almeida *et al.* [17], o tamanho da amostra foi menor quando comparado ao nosso estudo, além do fato de que a única indicação de uso para varfarina foi trombose venosa profunda

enquanto em nosso estudo, a principal indicação foi fibrilação atrial. Além disso, a média de idade dos pacientes de nosso estudo foi maior ( $64,1 \pm 13,1$  anos vs.  $42,3 \pm 14,5$  anos) [17]. Já Kim *et al.* [6] encontraram frequências semelhantes às nossas [35,7% (CC); 45,9% (CT); 18,4% (TT)] em um estudo conduzido com 196 pacientes de diferentes etnias. O gene *MDR1* codifica uma proteína transmembrana (glicoproteína-P) que funciona como um transportador de efluxo, para o qual a varfarina é um substrato. O polimorfismo 3435 C>T em *MDR1* estaria associado à redução da absorção intestinal e ao aumento na eliminação hepática da varfarina, e conseqüente aumento da necessidade de dose [6,17]. Entretanto, estudos sugerem que polimorfismos em *MDR1* levariam a redução da expressão do gene [14,19] e conseqüente aumento na biodisponibilidade da varfarina.

No modelo genético de dominância [CC vs. (CT + TT)] foi encontrada uma associação desse polimorfismo com a dose de varfarina. Pacientes com pelo menos uma cópia do alelo 3435T apresentavam dose de manutenção média no valor de 27,3mg/semana em relação a 30,3mg/semana de pacientes homocigotos selvagens ( $p=0,045$ ). Esse resultado está em acordo com o estudo de Wadelius *et al.* [19] em que pacientes heterocigotos para um haplótipo específico de *MDR1* contendo o polimorfismo 3435 C>T, requeriam doses menores de varfarina. Igualmente, Kim *et al.* [6] encontraram que pacientes heterocigotos e homocigotos para o alelo 3435T faziam uso de doses menores de varfarina em relação a pacientes homocigotos para o alelo 3435C. Entretanto, essa diferença não foi significativa [6]. Por outro lado, no estudo de Almeida *et al.* [17], o polimorfismo C3435T esteve associado com resistência à varfarina. Pacientes com dose superior a 70mg/semana (resistência à varfarina) tinham 19 vezes mais chance de apresentar o genótipo 3435TT em relação a pacientes com genótipo 3435CC [17]. Em uma coorte egípcia, quando *MDR1* foi analisado separadamente, pacientes com genótipo 3435TT tiveram requerimentos de doses mais altas que pacientes com genótipo 3435CC, entretanto, essa diferença não foi significativa [14]. Quando *MDR1* foi combinado com outros dois genes, o genótipo *MDR1* 3435TT/ *EPHX1* 139RH,RR/ PZ-13AA foi associado a doses mais altas de varfarina que o genótipo *MDR1* 3435CC/ *EPHX1* 139RH,RR/ PZ-13AA ( $p=0,014$ ) [14]. Pelo fato de não ter sido avaliada neste estudo a

interação do gene *MDR1* com outros genes, além daqueles incluídos no estudo, esta seria uma hipótese para explicar o motivo de não ter sido observada associação independente do polimorfismo de *MDR1* com a dose de varfarina no modelo multivariado.

O gene *APOE* está relacionado a captação hepática de vitamina K [13]. Em nosso estudo, os alelos polimórficos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  tiveram frequências, respectivamente, de 6,2%, 78,9% e 14,9%. Outro estudo brasileiro encontrou frequências semelhantes, contabilizando 9,1% para  $\epsilon 2$ , 75,4% para  $\epsilon 3$  e 15,5% para  $\epsilon 4$  [1]. Não encontramos qualquer associação de *APOE* com a dose de varfarina em nossa amostra, apesar de uma dose média ligeiramente maior ter sido observada em pacientes com dois alelos *APOE*  $\epsilon 4$  em relação a pacientes com apenas um ou nenhum alelo *APOE*  $\epsilon 4$ . Estudos na literatura apresentam resultados controversos. Enquanto alguns encontraram correlação positiva [13,18] ou negativa [1,11] do alelo *APOE*  $\epsilon 4$  com a dose de varfarina, outros não encontraram qualquer tipo de associação [9,27]. Em teoria, devido à acelerada captação de vitamina K pelo fígado, indivíduos carreadores de pelo menos um alelo *APOE*  $\epsilon 4$  necessitariam de dose maior de varfarina para promover o efeito anticoagulante [13]. Entretanto, de acordo com Visser *et al.* [28], a presença de *APOE*  $\epsilon 4$  levaria à redução da necessidade de dose dos anticoagulantes cumarínicos uma vez que além de promover a captação elevada de vitamina K, esse alelo também estaria associado a um desvio de rota mediando a direta eliminação da vitamina K captada, diminuindo, portanto, sua disponibilidade hepática para atuar no ciclo de carboxilação dos fatores da coagulação.

Kohnke *et al.* [13] conduziram um estudo com 183 pacientes suecos. Dentre os 122 pacientes *CYP2C9*\*1/\*1, aqueles com genótipo *APOE*  $\epsilon 4/\epsilon 4$  requeriam doses maiores de varfarina que pacientes com um ou nenhum alelo *APOE*  $\epsilon 4$  [13]. O mesmo foi observado em uma coorte de pacientes caucasianos e afro-americanos em que pacientes  $\epsilon 2/\epsilon 2$  e  $\epsilon 2/\epsilon 3$  tiveram a menor mediana de dose de manutenção de varfarina, aqueles com genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  tiveram dose intermediária e os pacientes  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$  tiveram o maior requerimento de dose [18]. Afro-americanos tiveram maior frequência do alelo *APOE*  $\epsilon 4$  (21,1%) do que caucasianos (13,6%), e também apresentaram maior dose de manutenção semanal média de varfarina [18]. Por outro lado, Almeida *et al.* [1] demonstraram

que pacientes brasileiros com pelo menos um alelo APOE  $\epsilon$ 4 utilizavam dose de varfarina 21% menor do que aqueles sem o alelo. Redução na dose também foi demonstrada por Sconce *et al.* [11] em pacientes caucasianos com pelo menos um alelo APOE  $\epsilon$ 4 em relação àqueles com genótipo  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3.

No modelo de regressão gama desenvolvido, além dos genótipos para *CYP2C9* e *VKORC1*, as variáveis idade e uso de amiodarona foram associadas com redução na dose de manutenção semanal média de varfarina nos pacientes do estudo. Vários estudos têm relatado uma associação negativa entre idade e dose de varfarina [1,3,7-10,14,16,19,27]. Com o aumento na idade, ocorre uma diminuição no metabolismo hepático da varfarina [1] e redução nos estoques de vitamina K e na concentração plasmática dos fatores da coagulação [15]. Já a amiodarona é um inibidor do metabolismo da varfarina e potencializa seu efeito anticoagulante [15]. Botton *et al.* [16], Perini *et al.* [8] e Santos *et al.* [7] desenvolveram modelos de predição da dose de varfarina para população brasileira em que amiodarona aparece como uma das variáveis inclusa nos algoritmos. Um coeficiente de determinação de 5,6% foi encontrado para amiodarona no estudo de Perini *et al.* [8]. Muitos estudos têm construído algoritmos para determinação da dose de varfarina em que os genes *CYP2C9* e *VKORC1* entram como os principais fatores que explicam a variabilidade na dose [1,3,7-10,16]. O modelo desenvolvido por Perini *et al.* [8] explicou 50,4% da variação global na dose de varfarina. Dos 50,4%, 30,7% foram devidos somente às variáveis genéticas *CYP2C9* e *VKORC1* [8]. Apesar da associação significativa com a dose de varfarina, não detectamos qualquer interação entre os genes *CYP2C9* e *VKORC1* ( $p=0,209$ ). Isso indica que esses dois genes afetam a dose de varfarina independentemente, e um não modifica o efeito do outro na dose. Resultado semelhante foi apresentado por Khalighi *et al.* [4]. Já Li *et al.* [2], detectou uma interação significativa entre *CYP2C9* e *VKORC1* em dois grupos populacionais distintos de seu estudo. Entretanto, a contribuição da interação quando incluída no modelo de predição da dose de varfarina desenvolvido foi quase nula [2].

Há algumas limitações nesse estudo. Primeiramente, variáveis como consumo de vitamina K, adesão ao tratamento, peso corporal e altura, por exemplo, não foram avaliadas. Entretanto, assumimos que os pacientes foram

adequadamente educados e relataram seguir as orientações dadas sobre a terapia com varfarina durante o acompanhamento nas clínicas de anticoagulação. Etnia não foi uma variável incluída no estudo, uma vez que assumimos que a população de Belo Horizonte, assim como a população brasileira, é altamente miscigenada havendo, portanto, dificuldade em sua determinação [29,30]. A frequência de alguns genótipos foi muito baixa, o que pode ter sido insuficiente para demonstrar associação com a dose de varfarina. Devido ao pequeno número de pacientes com doses acima de 70mg/semana ou abaixo de 17,5mg/semana, também não foi possível realizar uma análise de resistência ou sensibilidade à varfarina, respectivamente. A dose de varfarina também pode ter associação com outros genes, até então desconhecida, e que não foi investigada neste estudo. Não se sabe se todos os três centros utilizaram o mesmo reagente de tromboplastina para o cálculo da RNI, e se diferente, isso pode impactar no resultado e, então, na dose de varfarina. Por fim, alguns dados foram coletados retrospectivamente por meio da análise de prontuários, o que pode limitar a recuperação de informações.

Em conclusão, idade, uso de amiodarona e polimorfismos *CYP2C9*\*2 e \*3 no gene *CYP2C9* e -1639 G>A em *VKORC1* foram associados com redução na dose de varfarina. Em conjunto, essas informações permitem obter melhor conhecimento da nossa população, e assim contribuem para subsidiar melhorias no processo de cuidado ao paciente. Na população do estudo, os polimorfismos em *CYP2C9* e *VKORC1* podem contribuir para explicar porque determinados pacientes requerem doses menores de varfarina para atingir o alvo terapêutico da RNI. Enquanto flutuações na RNI e, conseqüentemente na dose de varfarina, podem ser resultantes da influência de fatores sociodemográficos e farmacoterápicos. Apesar de polimorfismos em *MDR1* e *APOE* não terem sido significativamente associados à dose de varfarina neste estudo, ressaltamos a relevância de se estudar esses dois genes com resultados controversos na literatura internacional e com poucas informações na população brasileira. Uma associação sugestiva entre *MDR1* e a dose semanal de varfarina foi encontrada no modelo genético de dominância, e talvez haja necessidade de mais estudos para comprovar essa associação. Além disso, este estudo pode servir como um



direcionamento para que novos estudos, principalmente aqui no Brasil, sejam desenvolvidos.

**Financiamento.** Esse estudo foi financiado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). MOC Rocha, RP Souza e KB Gomes são pesquisadores do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Conflitos de Interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### **REFERÊNCIAS**

1. Almeida VCO, 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**:675-83.
2. Li X, Liu R, Yan H, Tang J, Yin JY, Mao XY et al. Effect of CYP2C9-VKORC1 interaction on warfarin stable dosage and its predictive algorithm. *J Clin Pharmacol* 2015;**55**:251-7.
3. 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**:453-8.
4. Khalighi K, Cheng G, Mirabbasi S, Khalighi B, Wu Y, Fan W. Linkage disequilibrium between the CYP2C19\*2,\*17 and CYP2C9\*1 alleles and impact of VKORC1, CYP2C9, CYP2C19 gene polymorphisms and gene-gene interactions on warfarin therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2017;**43**:124-9.
5. Martins MA, Carlos PP, Ribeiro DD, Nobre VA, Cesar CC, Rocha MO et al. Warfarin drug interactions: a comparative evaluation of the lists provided by five information sources. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;**67**:1301-8.
6. Kim Y, Smith A, Wu AH. C3435T polymorphism of MDR1 gene with warfarin resistance. *Clin Chim Acta* 2013;**425**:34-6.

7. Santos PC, Marcatto LR, Duarte NE, Gadi Soares RA, Cassaro Strunz CM, Scanavacca M 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**:865-76.
8. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008;**84**:722-8.
9. Cavallari LH, Langae TY, Momary KM, Shapiro NL, Nutescu EA, Coty WA et al. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2010;**87**:459-64.
10. Liu R, Cao J, Zhang Q, Shi XM, Pan XD, Dong R. Clinical and genetic factors associated with warfarin maintenance dose in northern Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Medicine* 2017;**96**:e5658.
11. Sconce EA, Daly AK, Khan TI, Wynne HA, Kamali F. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. *Pharmacogenet Genomics* 2006;**16**:609-11.
12. Johnson JA, Cavallari LH. Warfarin pharmacogenetics. *Trends Cardiovasc Med* 2015;**25**:33-41.
13. Kohnke H, Sorlin K, Granath G, Wadelius M. Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;**61**:381-8.
14. 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**:73-83.
15. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;**141**:e44S-e88S.
16. 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**:442-50.
17. Almeida VCO, 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**:2120-2.

18. Kimmel SE, Christie J, Kealey C, Chen Z, Price M, Thorn CF et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. *Pharmacogenomics J* 2008;**8**:53-60.

19. Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PK et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics J* 2004;**4**:40-8.

20. Ramos AS, Seip RL, Rivera-Miranda G, Felici-Giovanini ME, Garcia-Berdecia R, Alejandro-Cowan Y et al. Development of a pharmacogenetic-guided warfarin dosing algorithm for Puerto Rican patients. *Pharmacogenomics* 2012;**13**:1937-50.

21. Xu Q, Xu B, Zhang Y, Yang J, Gao L, Wang H et al. Estimation of the warfarin dose with a pharmacogenetic refinement algorithm in Chinese patients mainly under low-intensity warfarin anticoagulation. *Thromb Haemost* 2012;**108**:1132-40.

22. Mourão AOM, Gomes KB, Reis EA, Souza RP, Campos EIF, Ribeiro DD et al. Creation of an algorithm for predicting doses of warfarin <17.5 mg using CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms and non-genetic factors. In: Annual Scientific and Standardization Committee Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 64., 2018, Dublin. Abstract.

23. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;**106**:3143-421.

24. Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Ann Intern Med* 1984;**101**:847-51.

25. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briet E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost* 1993;**69**:236-9.

26. Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J, Flaker G, Commerford P, Franzosi MG et al. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by

centers and countries as measured by time in therapeutic range. *Circulation* 2008;**118**:2029-37.

27. Lal S, Sandanaraj E, Jada SR, Kong MC, Lee LH, Goh BC et al. Influence of APOE genotypes and VKORC1 haplotypes on warfarin dose requirements in Asian patients. *Br J Clin Pharmacol* 2008;**65**:260-4.

28. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, van Duijn CM et al. Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics* 2005;**15**:69-74.

29. Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, de Moraes ME, Pena SD et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. *PloS One* 2014;**9**:e110691.

30. Suarez-Kurtz G, Botton MR. Pharmacogenetics of coumarin anticoagulants in Brazilians. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;**11**:67-79.

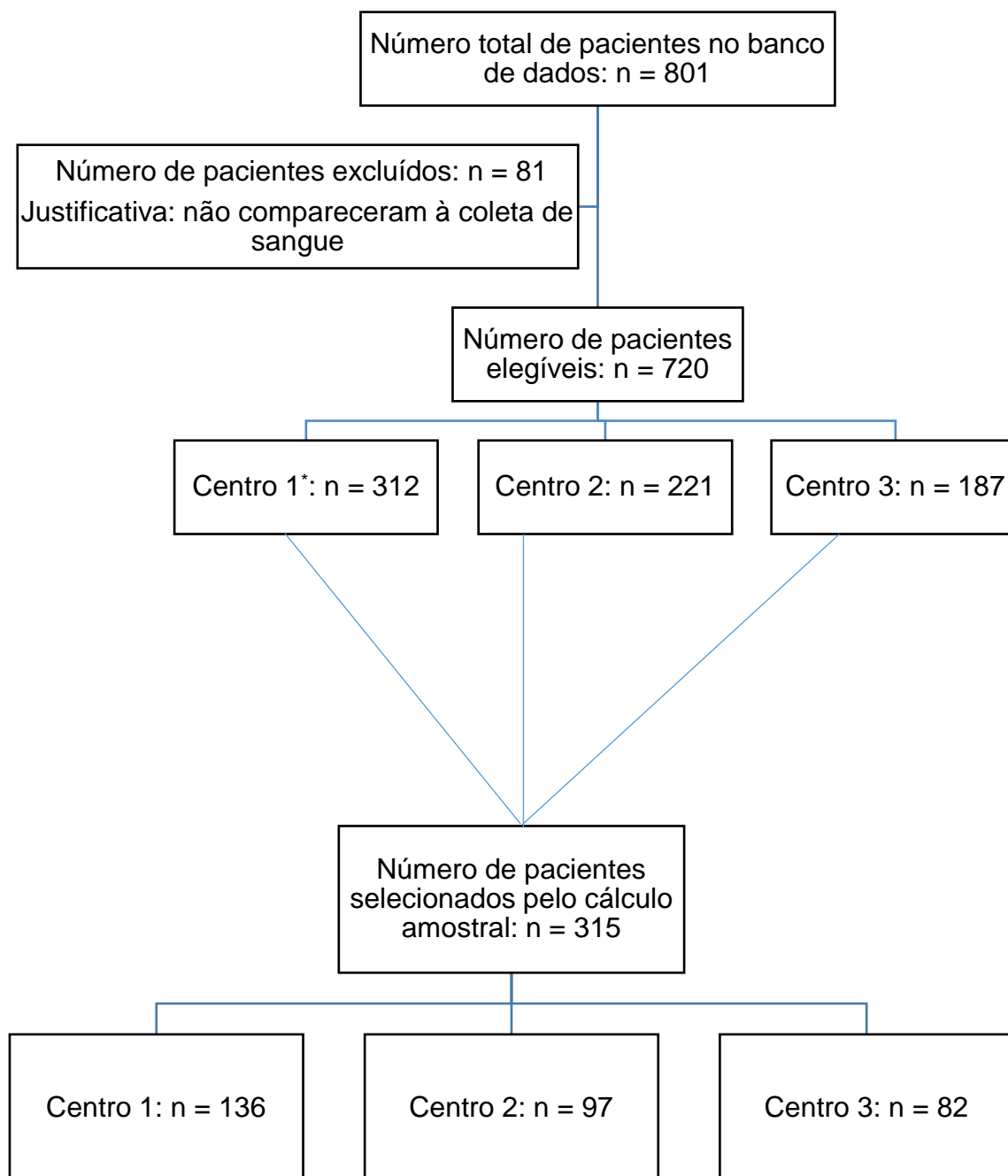


Figura 1 - Fluxograma representativo da seleção do grupo amostral. (HC-UFMG, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária). \*(22)

Tabela 1 - Características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e farmacoterapêuticas dos pacientes do estudo por clínica de anticoagulação.

Característica	Total (n=315)	Centro 1 (HC-UFMG) (n= 136)	Centro 2 (HRTN) (n=97)	Centro 3 (URS Sagrada Família) (n= 82)	Valor p
Idade (anos), média±desvio padrão	64,1±13,1	60,1±13,6	65,9±12,3	68,6±11,3	<0,001
Idade (anos), n (%)					
≤49,9	43 (13,6)	28 (20,6)	10 (10,3)	5 (6,1)	0,001
50-60	67 (21,3)	37 (27,2)	17 (17,5)	13 (15,9)	
60,1-70,0	87 (27,6)	36 (26,5)	29 (29,9)	22 (26,8)	
≥70,1	118 (37,5)	35 (25,7)	41 (42,3)	42 (51,2)	
Sexo, n (%)					
Feminino	173 (54,9)	78 (57,4)	55 (56,7)	40 (48,8)	0,424
Masculino	142 (45,1)	58 (42,6)	42 (43,3)	42 (51,2)	
Grau de Escolaridade, n (%)					
Nunca estudou	34 (10,8)	15 (11,0)	10 (10,3)	9 (11,0)	0,672
Ensino fundamental incompleto	203 (64,4)	91 (66,9)	59 (60,8)	53 (64,7)	
Ensino fundamental completo	28 (8,9)	11 (8,1)	10 (10,3)	7 (8,5)	
Ensino médio incompleto	8 (2,5)	5 (3,7)	2 (2,0)	1 (1,2)	
Ensino médio completo	37 (11,8)	14 (10,3)	12 (12,4)	11 (13,4)	
Graduação incompleta	3 (1,0)	-	2 (2,1)	1 (1,2)	
Graduação completa	2 (0,6)	-	2 (2,1)	-	
Pós-graduação incompleta	-	-	-	-	
Pós-graduação completa	-	-	-	-	
Renda Mensal (dólares americanos), média±desvio padrão	227,50±179,95	178,66±117,26	243,79±202,37	289,30±214,22	<0,001
Necessidade de auxílio para administração de varfarina, n (%)	46 (14,6)	13 (9,6)	21 (21,6)	12 (14,6)	0,032
Tabagismo, n (%)	21 (6,7)	8 (5,9)	6 (6,2)	7 (8,5)	0,749
Consumo de álcool, n (%)	31 (9,8)	2 (1,5)	12 (12,4)	17 (20,7)	<0,001

Tabela 1 - Características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e farmacoterapêuticas dos pacientes do estudo por clínica de anticoagulação (continuação).

Característica	Total (n=315)	Centro 1 (HC-UFG) (n= 136)	Centro 2 (HRTN) (n=97)	Centro 3 (URS Sagrada Família) (n= 82)	Valor p
Indicação, n (%)*					
Fibrilação atrial/Flutter	240 (76,2)	98 (72,1)	76 (78,4)	66 (80,5)	0,304
Prótese mecânica de válvula mitral	44 (14,0)	32 (23,5)	5 (5,2)	7 (8,5)	<0,001
Prótese mecânica de válvula aórtica	28 (8,9)	24 (17,6)	2 (2,1)	2 (2,4)	<0,001
Prótese mecânica de válvula tricúspide	1 (0,3)	1 (0,7)	-	-	1,000
Prótese mecânica geral**	65 (20,6)	49 (36,0)	7 (7,2)	9 (11,0)	<0,001
AVCI/AIT	58 (18,4)	2 (1,5)	40 (41,2)	16 (19,5)	<0,001
Trombose venosa profunda	10 (3,2)	3 (2,2)	2 (2,1)	5 (6,1)	0,248
Tromboembolismo pulmonar	3 (1,0)	-	-	3 (3,7)	0,017
TEP/TVP***	13 (4,1)	3 (2,2)	2 (2,1)	8 (9,8)	0,013
Trombo intracardíaco	5 (1,6)	1 (0,7)	3 (3,1)	1 (1,2)	0,445
Faixa terapêutica da RNI, n (%)					
2,00-3,00	263 (83,5)	99 (72,8)	91 (93,8)	73 (89,0)	<0,001
2,50-3,50	52 (16,5)	37 (27,2)	6 (6,2)	9 (11,0)	
Tempo de tratamento com varfarina (anos), média±desvio padrão					
	3,6±3,3	4,2±3,7	2,9±3,3	3,2±2,5	0,009
Dose de manutenção semanal (mg), média±desvio padrão					
	28,5±13,1	30,5±15,2	27,9±12,3	25,7±9,4	0,027
TTR (%), média±desvio padrão					
	65,5±17,9	64,3±20,2	67,0±14,5	65,6±17,4	0,544
Número de comorbidades, média±desvio padrão					
	3,4±1,9	2,8±1,6	4,8±2,0	2,7±1,3	<0,001

Tabela 1 - Características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e farmacoterapêuticas dos pacientes do estudo por clínica de anticoagulação (continuação).

Característica	Total (n=315)	Centro 1 (HC-UFGM) (n= 136)	Centro 2 (HRTN) (n=97)	Centro 3 (URS Sagrada Família) (n= 82)	Valor p
<b>Comorbidades, n (%)*</b>					
Hipertensão arterial sistêmica	241 (76,5)	85 (62,5)	85 (87,6)	71 (86,6)	<0,001
Insuficiência cardíaca	126 (40,0)	43 (31,6)	52 (53,6)	31 (37,8)	0,003
Dislipidemia	113 (35,9)	53 (39,0)	45 (46,4)	15 (18,3)	<0,001
Doenças valvares	102 (32,4)	27 (19,9)	64 (66,0)	11 (13,4)	<0,001
Doenças respiratórias	68 (21,6)	16 (11,8)	44 (45,4)	8 (9,8)	<0,001
Diabetes	63 (20,0)	16 (11,8)	23 (23,7)	24 (29,3)	0,003
Doenças reumáticas	36 (11,4)	19 (14,0)	5 (5,2)	12 (14,6)	0,066
Doenças de Chagas	34 (10,8)	27 (19,9)	3 (3,1)	4 (4,9)	<0,001
Doenças do endocárdio, miocárdio e pericárdio	34 (10,8)	9 (6,6)	24 (24,7)	1 (1,2)	<0,001
Doenças neuropsiquiátricas	34 (10,8)	10 (7,4)	23 (23,7)	1 (1,2)	<0,001
Doença aórtica	33 (10,5)	2 (1,5)	31 (32,0)	-	<0,001
Hipotireoidismo	29 (9,2)	13 (9,6)	7 (7,2)	9 (11,0)	0,677
Doenças do TGI	22 (7,0)	8 (5,9)	14 (14,4)	-	0,001
Arritmias	19 (6,0)	-	6 (6,2)	13 (15,9)	<0,001
Doenças osteoarticulares	15 (4,8)	2 (1,5)	3 (3,1)	10 (12,2)	0,001
Doença arterial coronariana	13 (4,1)	11 (8,1)	1 (1,0)	1 (1,2)	0,006
Insuficiência renal	12 (3,8)	6 (4,4)	3 (3,1)	3 (3,7)	0,924
Outras doenças do trato geniturinário	5 (1,6)	1 (0,7)	4 (4,1)	-	0,061
Doenças infecciosas	3 (1,0)	3 (2,2)	-	-	0,123
Insuficiência hepática	3 (1,0)	3 (2,2)	-	-	0,129
Número de medicamentos em uso crônico, média±desvio padrão	5,9±2,1	5,8±1,9	6,1±2,4	5,7±2,1	0,298
<b>Medicamentos com potencial de interação com a varfarina, n (%)*</b>					
Sinvastatina	153 (48,6)	59 (43,4)	54 (55,7)	40 (48,8)	0,177
Ácido acetilsalicílico	71 (22,5)	52 (38,2)	8 (8,2)	11 (13,4)	<0,001
Amiodarona	34 (10,8)	16 (11,8)	9 (9,3)	9 (11,0)	0,871
Carbamazepina	2 (0,6)	-	1 (1,0)	1 (1,2)	0,514
Fenitoína	2 (0,6)	2 (1,5)	-	-	0,345

HC-UFGM, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária. AVCI, acidente vascular cerebral isquêmico. AIT, ataque isquêmico transitório. TEP, tromboembolismo pulmonar. TVP, trombose venosa profunda. RNI, relação normalizada internacional. TTR, *time in therapeutic range*. TGI, trato gastrointestinal. 1 dólar americano = R\$ 3,72 (15-06-2018). \*O mesmo paciente pode estar em mais de uma categoria da variável. \*\*Inclui pacientes com prótese mecânica de válvula aórtica, prótese mecânica de válvula mitral e prótese mecânica de válvula tricúspide. \*\*\*Inclui pacientes com tromboembolismo pulmonar e trombose venosa profunda.



Tabela 2 - Frequências alélicas e genotípicas de *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* por clínica de anticoagulação.

Gene/Genótipos	Total (n=315)	Centro 1 (HC-UFGM) (n= 136)	Centro 2 (HRTN) (n=97)	Centro 3 (URS Sagrada Família) (n= 82)	Valor p
<b>CYP2C9, n (%)</b>					
*1/*1	222 (70,5)	95 (69,9)	71 (73,3)	56 (68,3)	0,689
*1/*2	58 (18,4)	23 (16,9)	17 (17,5)	18 (22,0)	
*1/*3	26 (8,3)	12 (8,8)	7 (7,2)	7 (8,5)	
*2/*2	3 (0,9)	3 (2,2)	-	-	
*2/*3	5 (1,6)	3 (2,2)	1 (1,0)	1 (1,2)	
*3/*3	1 (0,3)	-	1 (1,0)	-	
*1	528 (83,8)	225 (82,7)	166 (85,6)	137 (83,5)	
*2	69 (11,0)	32 (11,8)	18 (9,3)	19 (11,6)	
*3	33 (5,2)	15 (5,5)	10 (5,1)	8 (4,9)	
<b>VKORC1, n (%)</b>					
GG	151 (47,9)	66 (48,5)	46 (47,5)	39 (47,6)	0,944
GA	125 (39,7)	51 (37,5)	40 (41,2)	34 (41,5)	
AA	39 (12,4)	19 (14,0)	11 (11,3)	9 (10,9)	
G	427(67,8)	183 (67,3)	132 (68,0)	112 (68,3)	0,983
A	203 (32,2)	89 (32,7)	62 (32,0)	52 (31,7)	
<b>MDR1, n (%)</b>					
CC	125 (39,7)	55 (40,4)	37 (38,2)	33 (40,3)	0,604
CT	144 (45,7)	57 (41,9)	49 (50,5)	38 (46,3)	
TT	46 (14,6)	24 (17,7)	11 (11,3)	11 (13,4)	
C	394 (62,5)	167 (61,4)	123 (63,4)	104 (63,4)	0,933
T	236 (37,5)	105 (38,6)	71 (36,6)	60 (36,6)	
<b>APOE, n (%)</b>					
ε3/ε3	198 (62,9)	84 (61,7)	56 (57,7)	58 (70,8)	0,369
ε2/ε2	2 (0,6)	-	1 (1,0)	1 (1,2)	
ε2/ε3	30 (9,5)	16 (11,8)	12 (12,4)	2 (2,4)	
ε2/ε4	5 (1,6)	2 (1,5)	2 (2,1)	1 (1,2)	
ε3/ε4	71 (22,5)	32 (23,5)	22 (22,7)	17 (20,7)	
ε4/ε4	9 (2,9)	2 (1,5)	4 (4,1)	3 (3,7)	
ε2	39 (6,2)	18 (6,6)	16 (8,2)	5 (3,1)	
ε3	497 (78,9)	216 (79,4)	146 (75,3)	135 (82,3)	
ε4	94 (14,9)	38 (14,0)	32 (16,5)	24 (14,6)	

HC-UFGM, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária.

Tabela 3 - Relação dos genótipos de *CYP2C9*, *VKORC1*, *MDR1* e *APOE* com a dose de manutenção semanal média de varfarina.

Gene	Modelo genético	Genótipos	n (%)	Dose de manutenção (mg/semana), média±desvio-padrão	Diferença de dose em relação ao(s) genótipo(s) de referência (IC, 95%)	Valor p
CYP2C9	Codominante	*1/*1	222 (70,4)	31,2±13,4	0	
		*1/*2 ou *1/*3	84 (26,7)	22,4±10,1	-8,8 (-11,9; -5,7)	<0,001
		*2/*2 ou *2/*3 ou *3/*3	9 (2,9)	15,5±5,1	-15,7 (-24,0; -7,5)	<0,001*
	log-aditivo	0,1,2			-8,5 (-11,1; -5,9)	<0,001
VKORC1	Codominante	GG	151 (47,9)	33,5±14,7	0	
		GA	125 (39,7)	25,8±10,1	-7,7 (-10,5; -4,9)	<0,001
		AA	39 (12,4)	17,2±5,6	-16,3 (-20,5; -12,1)	<0,001**
	log-aditivo	0,1,2			-8,0 (-9,9; -6,1)	<0,001
MDR1	Codominante	CC	125 (39,7)	30,3±14,5	0	0,126
		CT	144 (45,7)	27,5±10,8	-2,8 (-5,9; 0,31)	
		TT	46 (14,6)	26,6±15,6	-3,7 (-8,1; 0,8)	
	log-aditivo	0,1,2			-2,1 (-4,2; 0,01)	0,052
APOE	Codominante	ε2/ε2 ou ε2/ε3 ou ε3/ε3	230 (73,0)	28,6±13,6	0	0,761
		ε2/ε4 ou ε3/ε4	76 (24,1)	27,7±13,1	-0,9 (-4,4; 2,4)	
		ε4/ε4	9 (2,9)	30,6±13,8	2,0 (-6,8; 10,7)	
	log-aditivo	0,1,2			-0,3 (-3,1; 2,6)	0,857

IC, intervalo de confiança. \*O valor p para a diferença de dose entre (\*1/\*2 ou \*1/\*3) e (\*2/\*2 ou \*2/\*3 ou \*3/\*3) foi 0,247. \*\*O valor p para a diferença de dose entre (GA) e (AA) foi <0,001.

Tabela 4 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas categóricas.

Variável	n (%)	Dose de manutenção (mg/semana), média±desvio padrão	Valor p
<b>Idade (anos)</b>			
≤49,9	43 (13,6)	37,5±17,0	<0,001
50-60	67 (21,3)	32,4±13,6	
60,1-70,0	87 (27,6)	27,6±10,5	
≥70,1	118 (37,5)	23,6±10,5	
<b>Grau de Escolaridade</b>			
Nunca estudou	34 (10,8)	26,3±13,4	0,107
Ensino fundamental incompleto	203 (64,4)	27,6±12,6	
Ensino fundamental completo	28 (8,9)	34,2±13,9	
Ensino médio incompleto	8 (2,5)	32,7±11,3	
Ensino médio completo	37 (11,8)	30,7±14,6	
Graduação incompleta	3 (1,0)	20,2±18,3	
Graduação completa	2 (0,6)	24,1±3,3	
<b>Necessidade de auxílio para administração de varfarina</b>			
Sim	46 (14,6)	24,9±14,1	0,066
Não	269 (85,4)	29,1±12,9	
<b>Clínica de anticoagulação</b>			
Centro 1 (HC-UFGM)	136 (43,2)	30,5±15,2	0,027
Centro 2 (HRTN)	97 (30,8)	27,9±12,3	
Centro 3 (URS Sagrada Família)	82 (26,0)	25,7±9,4	
<b>Indicação*</b>			
<b>Fibrilação atrial/Flutter</b>			
Sim	240 (76,2)	26,5±11,8	<0,001
Não	75 (23,8)	34,8±15,0	
<b>Prótese mecânica de válvula aórtica</b>			
Sim	28 (8,9)	35,8±16,3	0,016
Não	287 (91,1)	27,7±12,6	
<b>Prótese mecânica de válvula mitral</b>			
Sim	44 (14,0)	36,9±17,4	0,001
Não	271 (86,0)	27,1±11,8	
<b>Prótese mecânica geral**</b>			
Sim	65 (20,6)	34,9±16,0	<0,001
Não	250 (79,4)	26,8±11,7	

Tabela 4 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas categóricas (continuação).

Variável	n (%)	Dose de manutenção (mg/semana), média±desvio padrão	Valor p
Trombose venosa profunda			
Sim	10 (3,2)	39,1±18,8	0,099
Não	305 (96,8)	28,1±12,8	
Faixa terapêutica da RNI			
2,00-3,00	263 (83,5)	26,9±11,5	<0,001
2,50-3,50	52 (16,5)	36,5±17,5	
Comorbidades*			
Hipertensão arterial sistêmica			
Sim	241 (76,5)	27,7±11,7	0,134
Não	74 (23,5)	30,9±16,8	
Insuficiência cardíaca			
Sim	126 (40,0)	27,2±12,2	0,146
Não	189 (60,0)	29,3±13,7	
Dislipidemia			
Sim	113 (35,9)	27,2±12,0	0,179
Não	202 (64,1)	29,2±13,7	
Doenças respiratórias			
Sim	68 (21,6)	25,5±9,9	0,011
Não	247 (78,4)	29,3±13,8	
Diabetes			
Sim	63 (20,0)	26,8±10,6	0,193
Não	252 (80,0)	28,9±13,7	
Doenças neuropsiquiátricas			
Sim	34 (10,8)	31,4±13,5	0,183
Não	281 (89,2)	28,1±13,1	
Doenças do TGI			
Sim	22 (7,0)	24,3±9,0	0,041
Não	293 (93,0)	28,8±13,3	
Arritmias			
Sim	19 (6,0)	23,7±10,2	0,054
Não	296 (94,0)	28,8±13,2	
Doenças osteoarticulares			
Sim	15 (4,8)	23,1±7,6	0,015
Não	300 (95,2)	28,7±13,3	
Doença arterial coronariana			
Sim	13 (4,1)	21,5±7,8	0,006
Não	302 (95,9)	28,8±13,2	

Tabela 4 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas categóricas (continuação).

Variável	n (%)	Dose de manutenção (mg/semana), média±desvio padrão	Valor p
Insuficiência renal			
Sim	12 (3,8)	24,5±8,9	0,147
Não	303 (96,2)	28,6±13,2	
Outras doenças do trato geniturinário			
Sim	5 (1,6)	25,0±4,0	0,123
Não	310 (98,4)	28,5±13,2	
Doenças infecciosas			
Sim	3 (1,0)	39,7±7,0	0,101
Não	312 (99,0)	28,3±13,1	
Insuficiência hepática			
Sim	3 (1,0)	22,9±1,8	0,009
Não	312 (99,0)	28,5±13,2	
Medicamentos com potencial de interação com a varfarina*			
Sinvastatina			
Sim	153 (48,6)	26,1±11,4	0,002
Não	162 (51,4)	30,7±14,3	
Ácido acetilsalicílico			
Sim	71 (22,5)	31,8±16,6	0,042
Não	244 (77,5)	27,5±11,8	
Amiodarona			
Sim	34 (10,8)	25,4±12,0	0,127
Não	281 (89,2)	28,8±13,2	

HC-UFMG, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. HRTN, Hospital Risoleta Tolentino Neves. URS, Unidade de Referência Secundária. RNI, relação normalizada internacional. TGI, trato gastrointestinal. \*O mesmo paciente pode estar em mais de uma categoria da variável. \*\*Inclui pacientes com prótese mecânica de válvula aórtica e prótese mecânica de válvula mitral.

Tabela 5 - Resultado da análise univariada ( $p < 0,20$ ) para as variáveis não genéticas contínuas.

Variável	Média±desvio padrão	Coeficiente de correlação de Pearson	Valor t	Valor p
Idade (anos)	64,1±13,1	-0,395	-7,599	<0,001
TTR (%)	65,5±17,9	-0,148	-2,652	0,008
Número de comorbidades	3,4±1,9	-0,149	-2,664	0,008
Número de medicamentos em uso crônico	5,9±2,1	-0,149	-2,664	0,008

TTR, *time in therapeutic range*.

Tabela 6 - Modelo de regressão gama com função de ligação logarítmica para dose de manutenção semanal média de varfarina (mg/semana).

Variável	Coefficiente estimado	Erro Padrão do Coeficiente	Valor t	Valor p	Efeito sobre a dose semanal média
Intercepto	4,355	0,094	46,096	<0,001	-
Idade (anos)	-0,012	0,001	-8,006	<0,001	-10,97% (10 anos)
Uso de amiodarona	-0,196	0,059	-3,320	0,001	-17,81%
VKORC1 GA	-0,262	0,039	-6,707	<0,001	-23,05%
VKORC1 AA	-0,641	0,058	-11,052	<0,001	-47,30%
CYP2C9 *1/*2 ou *1/*3	-0,231	0,042	-5,483	<0,001	-20,63%
CYP2C9 *2/*2 ou *2/*3 ou *3/*3	-0,747	0,110	-6,798	<0,001	-52,63%

## 7 CONCLUSÃO

No modelo de regressão gama construído, idade, uso de amiodarona e polimorfismos *CYP2C9*\*2 e \*3 e *VKORC1* -1639 G>A foram todos associados com redução da necessidade de dose da varfarina. Em conjunto, essas informações permitem obter melhor conhecimento da nossa população, e assim contribuem para subsidiar melhorias no processo de cuidado ao paciente.

Na população do estudo, os polimorfismos em *CYP2C9* e *VKORC1* podem contribuir para explicar porque determinados pacientes requerem doses menores de varfarina para atingir o alvo terapêutico da RNI. Enquanto flutuações na RNI e, conseqüentemente na dose de varfarina, podem ser resultantes da influência de fatores sociodemográficos e farmacoterápicos.

Apesar de polimorfismos em *MDR1* e *APOE* não terem sido significativamente associados à dose de varfarina, ressalta-se a relevância de se estudar esses dois genes com resultados controversos na literatura internacional e com poucas informações na população brasileira. Uma associação sugestiva entre *MDR1* e a dose semanal de varfarina foi encontrada no modelo genético de dominância, e talvez haja necessidade de mais estudos para comprovar essa associação. Além disso, este estudo pode servir como um direcionamento para que novos estudos, principalmente aqui no Brasil, sejam desenvolvidos.

A educação dos pacientes no que se refere ao uso de anticoagulantes é fundamental para a diminuição dos eventos adversos provocados pelo uso desta classe de medicamentos. Nesse contexto, a inserção do farmacêutico na equipe multidisciplinar pode contribuir de modo significativo para a qualidade do cuidado ao paciente. A orientação sobre o uso destes medicamentos pode contribuir para melhora na adesão e adoção de medidas corretas relacionadas ao tratamento, com conseqüentes benefícios aos pacientes e maior qualidade para terapia anticoagulante.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. L.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology (Carlton)**, v. 14, n. 5, p. 462-70, Aug 2009.

AGENO, W. *et al.* Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v. 141, n. 2 Suppl, p. e44S-e88S, Feb 2012.

ALMEIDA, V. C. O. *et al.* Association of the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and therapeutic doses of warfarin in thrombophilic patients. **J Thromb Haemost**, v. 9, n. 10, p. 2120-2, Oct 2011.

ALMEIDA, V. C. O. *et 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**, v. 18, n. 6, p. 675-83, Dec 2014.

AZZAM, H. *et al.* VKORC1 and CYP2C9 genotypes in Egyptian patients with warfarin resistance. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 27, n. 2, p. 121-6, Mar 2016.

BADER, L. A.; ELEWA, H. The Impact of Genetic and Non-Genetic Factors on Warfarin Dose Prediction in MENA Region: A Systematic Review. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0168732, 2016.

BAKER, W. L. *et al.* Meta-analysis to assess the quality of warfarin control in atrial fibrillation patients in the United States. **J Manag Care Pharm**, v. 15, n. 3, p. 244-52, Apr 2009.

BAZAN, N. S. *et al.* Factors affecting warfarin dose requirements and quality of anticoagulation in adult Egyptian patients: role of gene polymorphism. **Ir J Med Sci**, v. 183, n. 2, p. 161-72, Jun 2014.

BENAVIDES, F. *et al.* [Effect of VKORC1 and CYP2C9 variants on dosage of oral anticoagulants in Chilean individuals]. **Rev Med Chil**, v. 143, n. 11, p. 1369-76, Nov 2015.

BOTTON, M. R. *et al.* Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. **Br J Clin Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 442-50, Sep 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: **RENAME 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

CARLQUIST, J. F. *et al.* An evaluation of nine genetic variants related to metabolism and mechanism of action of warfarin as applied to stable dose prediction. **J Thromb Thrombolysis**, v. 30, n. 3, p. 358-64, Oct 2010.

CAVALLARI, L. H. *et al.* Association of apolipoprotein E genotype with duration of time to achieve a stable warfarin dose in African-American patients. **Pharmacotherapy**, v. 31, n. 8, p. 785-92, Aug 2011.

CAVALLARI, L. H. *et al.* Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. **Clin Pharmacol Ther**, v. 87, n. 4, p. 459-64, Apr 2010.

CHOWDHURY, Z. S. *et al.* Effect of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms on warfarin dose requirement in Bangladeshi population. **Pak J Pharm Sci**, v. 30, n. 2, p. 341-346, Mar 2017.

CONNOLLY, S. J. *et al.* Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as measured by time in therapeutic range. **Circulation**, v. 118, n. 20, p. 2029-37, Nov 11 2008.

DEAN, L. Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1. In: PRATT, V.;MCLEOD, H., *et al* (Ed.). **Medical Genetics Summaries**. Bethesda MD, 2012.

EDELBERG, J. M.; CHRISTIE, P. D.; ROSENBERG, R. D. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. **Circ Res**, v. 89, n. 2, p. 117-24, Jul 20 2001.

ERIKSSON, N. *et al.* Genetic determinants of warfarin maintenance dose and time in therapeutic treatment range: a RE-LY genomics substudy. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 13, p. 1425-39, Aug 2016.

FARZAMIKIA, N.; SAKHINIA, E.; AFRASIABIRAD, A. Pharmacogenetics-Based Warfarin Dosing in Patients With Cardiac Valve Replacement: The Effects of CYP2C9 and VKORC1 Gene Polymorphisms. **Lab Med**, v. 49, n. 1, p. 25-34, Dec 22 2017.

FERRARI, M. *et al.* Association between ABCG2 and ABCB1 genes and warfarin stability: a case-control study. **Thromb Res**, v. 134, n. 6, p. 1359-62, Dec 2014.

FRIEDRICH, D. C. *et al.* Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110691, 2014.

FURIE, B. Do pharmacogenetics have a role in the dosing of vitamin K antagonists? **N Engl J Med**, v. 369, n. 24, p. 2345-6, Dec 12 2013.

GAIKWAD, T. *et al.* Influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on warfarin dosage, over anticoagulation and other adverse outcomes in Indian population. **Eur J Pharmacol**, v. 710, n. 1-3, p. 80-4, Jun 15 2013.

GHOZLAN, M. F. *et al.* Impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms upon warfarin dose requirements in Egyptian patients with acute coronary syndrome. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 26, n. 5, p. 499-504, Jul 2015.

GSCHWIND, L. *et al.* P-glycoprotein: a clue to vitamin K antagonist stabilization. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 2, p. 129-36, Jan 2015.

HART, R. G.; PEARCE, L. A.; AGUILAR, M. I. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. **Ann Intern Med**, v. 146, n. 12, p. 857-67, Jun 19 2007.

ISSAC, M. S.; EL-NAHID, M. S.; WISSA, M. Y. 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**, v. 18, n. 1, p. 73-83, Feb 2014.

JIANG, N. X. *et al.* Clinical application of a new warfarin-dosing regimen based on the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in atrial fibrillation patients. **Biomed Rep**, v. 4, n. 4, p. 453-458, Apr 2016.

JIN, B. *et al.* The impact of VKORC1-1639G > A genetic polymorphism upon warfarin dose requirement in different ethnic populations. **Curr Med Res Opin**, v. 30, n. 8, p. 1505-11, Aug 2014.

JOHNSON, J. A. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. **Clin Pharmacol Ther**, v. 102, n. 3, p. 397-404, Sep 2017.

JOHNSON, J. A.; CAVALLARI, L. H. Warfarin pharmacogenetics. **Trends Cardiovasc Med**, v. 25, n. 1, p. 33-41, Jan 2015.

KHALIGHI, K. *et al.* Linkage disequilibrium between the CYP2C19\*2,\*17 and CYP2C9\*1 alleles and impact of VKORC1, CYP2C9, CYP2C19 gene polymorphisms and gene-gene interactions on warfarin therapy. **J Thromb Thrombolysis**, v. 43, n. 1, p. 124-129, Jan 2017.

KIM, Y.; SMITH, A.; WU, A. H. C3435T polymorphism of MDR1 gene with warfarin resistance. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 34-6, Oct 21 2013.

KIMMEL, S. E. *et al.* Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. **Pharmacogenomics J**, v. 8, n. 1, p. 53-60, Feb 2008.

KOHNKE, H. *et al.* Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 61, n. 5-6, p. 381-8, Jul 2005.

KRISHNA KUMAR, D. *et al.* Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and GGXX genetic variants on warfarin maintenance dose and explicating a new pharmacogenetic algorithm in South Indian population. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 70, n. 1, p. 47-56, Jan 2014.

KUDZI, W. *et al.* Genetic polymorphisms of patients on stable warfarin maintenance therapy in a Ghanaian population. **BMC Res Notes**, v. 9, n. 1, p. 507, Dec 9 2016.

LAL, S. *et al.* Pharmacogenetics of target genes across the warfarin pharmacological pathway. **Clin Pharmacokinet**, v. 45, n. 12, p. 1189-200, 2006.

LAL, S. *et al.* Influence of APOE genotypes and VKORC1 haplotypes on warfarin dose requirements in Asian patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 65, n. 2, p. 260-4, Feb 2008.

LEE, M. T.; KLEIN, T. E. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities. **J Hum Genet**, v. 58, n. 6, p. 334-8, Jun 2013.

LI, S. *et al.* Warfarin dosage response related pharmacogenetics in Chinese population. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116463, 2015.

LI, Y.; ZHU, J.; DING, J. VKORC1 -1639G/A and 1173 C/T Genetic Polymorphisms Influence Individual Differences in Warfarin Maintenance Dose. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 19, n. 9, p. 488-93, Sep 2015.

LIANG, Y. *et al.* Association of genetic polymorphisms with warfarin dose requirements in Chinese patients. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 17, n. 12, p. 932-6, Dec 2013.

LIMDI, N. A. *et al.* Race influences warfarin dose changes associated with genetic factors. **Blood**, v. 126, n. 4, p. 539-45, Jul 23 2015.

LIU, R. *et al.* Clinical and genetic factors associated with warfarin maintenance dose in northern Chinese patients with mechanical heart valve replacement. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 2, p. e5658, Jan 2017.

LIU, R. *et al.* Association of apolipoprotein E (APOE) polymorphisms with warfarin maintenance dose in a northern Han Chinese population. **Lipids Health Dis**, v. 15, p. 34, Feb 24 2016.

LOPEZ, I. *et al.* Can pharmacogenetics help patients under chronic treatment with coumarin anticoagulants? **Drug Metab Pers Ther**, v. 31, n. 4, p. 191-196, Dec 1 2016.

MARCOLINO, M. S. *et al.* Atrial fibrillation: prevalence in a large database of primary care patients in Brazil. **Europace**, v. 17, n. 12, p. 1787-90, Dec 2015.

MARTINS, M. A. *et al.* Warfarin drug interactions: a comparative evaluation of the lists provided by five information sources. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 67, n. 12, p. 1301-8, Dec 2011.

MILI, F. D. *et al.* VKORC1-1639A allele influences warfarin maintenance dosage among Blacks receiving warfarin anticoagulation: a retrospective cohort study. **Future Cardiol**, v. 14, n. 1, p. 15-26, Jan 2018.

MITROPOULOU, C. *et al.* Economic evaluation of pharmacogenomic-guided warfarin treatment for elderly Croatian atrial fibrillation patients with ischemic stroke. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 2, p. 137-48, Jan 2015.

MOURÃO, Aline de Oliveira Magalhães. *Fatores genéticos e não genéticos relacionados às doses de varfarina e à qualidade do controle da anticoagulação em pacientes cardiopatas*. 2017. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PERINI, J. A. *et al.* Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients. **Clin Pharmacol Ther**, v. 84, n. 6, p. 722-8, Dec 2008.

PRICE, E. T. Warfarin pharmacogenomics and African ancestry. **Blood**, v. 126, n. 4, p. 434-6, Jul 23 2015.

QAYYUM, A. *et al.* Frequency of Common VKORC1 Polymorphisms and Their Impact on Warfarin Dose Requirement in Pakistani Population. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 24, n. 2, p. 323-329, Mar 2018.

RAFIEE, S. *et al.* Association of Warfarin Therapy with APOE and VKORC1 Genes Polymorphism in Iranian Population. **Iran J Pharm Res**, v. 16, n. 3, p. 1230-1237, Summer 2017.

RAMOS, A. S. *et al.* Development of a pharmacogenetic-guided warfarin dosing algorithm for Puerto Rican patients. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 16, p. 1937-50, Dec 2012.

RAZOUKI, Z. *et al.* Improving quality measurement for anticoagulation: adding international normalized ratio variability to percent time in therapeutic range. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes**, v. 7, n. 5, p. 664-9, Sep 2014.

REYNOLDS, M. W. *et al.* Warfarin anticoagulation and outcomes in patients with atrial fibrillation: a systematic review and metaanalysis. **Chest**, v. 126, n. 6, p. 1938-45, Dec 2004.

ROSENDAAL, F. R. *et al.* A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. **Thromb Haemost**, v. 69, n. 3, p. 236-9, Mar 1 1993.

SANTOS, P. C. *et al.* CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 69, n. 4, p. 789-97, Apr 2013.

SANTOS, P. C. *et al.* Development of a pharmacogenetic-based warfarin dosing algorithm and its performance in Brazilian patients: highlighting the importance of population-specific calibration. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 8, p. 865-76, Jul 2015.

SCHAPKAITZ, E.; SITHOLE, J. Predictors of warfarin dose requirements in South African patients attending an anticoagulation clinic. **J Vasc Nurs**, v. 35, n. 1, p. 27-30, Mar 2017.

SCONCE, E. A. *et al.* APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. **Pharmacogenet Genomics**, v. 16, n. 8, p. 609-11, Aug 2006.

SERMSATHANASAWADI, N. *et al.* The Influence of VKORC1 Polymorphisms on Warfarin Doses in Thai Patients with Deep Vein Thrombosis. **J Med Assoc Thai**, v. 98, n. 6, p. 549-54, Jun 2015.

SILVA, R. G. L. *et al.* Assessment of oral anticoagulation control at two pharmacist-managed clinics in Brazil. **Int J Clin Pharm**, v. 39, n. 6, p. 1157-1161, Dec 2017.

SKINNER, H. A. *et al.* Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. **Ann Intern Med**, v. 101, n. 6, p. 847-51, Dec 1984.

SPRONK, H. M.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W.; TEN CATE, H. The blood coagulation system as a molecular machine. **Bioessays**, v. 25, n. 12, p. 1220-8, Dec 2003.

SUAREZ-KURTZ, G.; BOTTON, M. R. Pharmacogenomics of warfarin in populations of African descent. **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 2, p. 334-46, Feb 2013.

SUAREZ-KURTZ, G.; BOTTON, M. R. Pharmacogenetics of coumarin anticoagulants in Brazilians. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 11, n. 1, p. 67-79, Jan 2015.

TANAKA, K. A.; KEY, N. S.; LEVY, J. H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. **Anesth Analg**, v. 108, n. 5, p. 1433-46, May 2009.

TELES, J. S.; FUKUDA, E. Y.; FEDER, D. Warfarin: pharmacological profile and drug interactions with antidepressants. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, p. 110-115, 2012.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. 25, p. 3143-421, Dec 17 2002.

VAN WALRAVEN, C. *et al.* Effect of study setting on anticoagulation control: a systematic review and metaregression. **Chest**, v. 129, n. 5, p. 1155-66, May 2006.

VISSER, L. E. *et al.* Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. **Pharmacogenet Genomics**, v. 15, n. 2, p. 69-74, Feb 2005.

WADELIUS, M. *et al.* Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. **Hum Genet**, v. 121, n. 1, p. 23-34, Mar 2007.

WADELIUS, M. *et al.* Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. **Pharmacogenomics J**, v. 4, n. 1, p. 40-8, 2004.



WHITE, H. D. *et al.* Comparison of outcomes among patients randomized to warfarin therapy according to anticoagulant control: results from SPORTIF III and V. **Arch Intern Med**, v. 167, n. 3, p. 239-45, Feb 12 2007.

WILSON, S. J. *et al.* Comparing the quality of oral anticoagulant management by anticoagulation clinics and by family physicians: a randomized controlled trial. **CMAJ**, v. 169, n. 4, p. 293-8, Aug 19 2003.

XU, Q. *et al.* Estimation of the warfarin dose with a pharmacogenetic refinement algorithm in Chinese patients mainly under low-intensity warfarin anticoagulation. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 6, p. 1132-40, Dec 2012.

YU, W. Y. *et al.* Influence of APOE Gene Polymorphism on Interindividual and Interethnic Warfarin Dosage Requirement: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cardiovasc Ther**, v. 34, n. 5, p. 297-307, Oct 2016.

**ANEXO A – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em  
Pesquisa da UFMG**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE –08136613.4.0000.5149

**Interessado(a):** Profa. Maria Auxiliadora Parreiras Martins  
Departamento de Produtos Farmacêuticos  
Faculdade de Farmácia- UFMG


**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de dezembro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Fatores de risco para complicações da anticoagulação oral em pacientes com doenças cardiovasculares atendidos em ambulatórios de referência em Belo Horizonte: um estudo de coorte**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO B – Folha de Aprovação da dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical**

	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL</p>	<p><b>UFMG</b></p>
---	--	--------------------

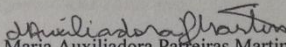
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

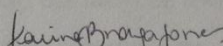
**"Influência de Polimorfismos nos Genes CYP2C9, VKORC1, MDR1 e APOE e variáveis sociodemográficas e clínicas na dose de Varfarina em pacientes atendidos em três clínicas de anticoagulação em Belo Horizonte - MG"**

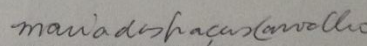
**EMÍLIO ITAMAR DE FREITAS CAMPOS**

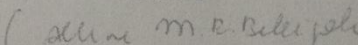
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

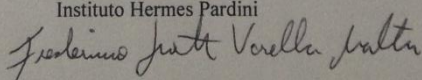
Aprovada em 10 de julho de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
 Prof. Maria Auxiliadora Parfeiras Martins - Orientadora  
 UFMG

  
 Prof. Karina Braga Gomes Borges - Coorientadora  
 UFMG

  
 Prof. Maria das Graças Carvalho  
 FUFMG

  
 Prof. Alline Maria Rezende Beleigoli  
 UFMG

Dr. Frederico Scott Varella Malta  
 Instituto Hermes Pardini  


Belo Horizonte, 10 de julho de 2018.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO DE PESQUISA: Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte

Prezado Sr.(a),

Algumas pessoas com doenças que aumentam a coagulação do sangue precisam usar remédio anticoagulante regularmente para evitar trombose e derrame. O excesso de efeito desse remédio pode causar sangramento. Por isso, o uso dos comprimidos de anticoagulante precisa ser acompanhado por um exame chamado RNI (Relação Normalizada Internacional) que ajuda na escolha da dose certa. Estamos realizando uma pesquisa para conhecer os fatores de risco para complicações do tratamento com varfarina que é um remédio anticoagulante. Com essas informações, será possível criar regras de tratamento para melhorar a qualidade da sua assistência.

Gostaríamos de convidá-lo(a) para participar dessa pesquisa como voluntário(a), sem custo algum pelos exames realizados. Se você não quiser participar não haverá qualquer problema no seu tratamento e assistência recebida pelo profissional de saúde. Para realizar este estudo, precisamos colher 10 mL do seu sangue para executar as etapas do projeto. A coleta de sangue poderá levar a uma leve dor localizada associada à picada da agulha ou pequena reação local. Para reduzir essa reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis. Outro risco associado à coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado. Seu prontuário médico também será consultado em busca de informações sobre sua doença e exames laboratoriais. Quando você vier fazer sua consulta de rotina, faremos uma entrevista de cerca de 20 minutos. Se necessário, forneceremos atestados de presença para justificar ausência no trabalho ou na escola. A pesquisa terá a duração de no mínimo dois anos e você poderá desistir de participar em qualquer momento.

É possível que você venha a se beneficiar diretamente dos resultados desse projeto, mas certamente contribuirá para que novos pacientes se beneficiem no futuro. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. No entanto, os pesquisadores e, algumas vezes, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, poderão ter acesso aos dados. Os resultados desse estudo serão publicados e/ou apresentados em encontros científicos, sendo que, em qualquer publicação, seu nome não será revelado.

A coordenadora do projeto é a Profa. Maria Auxiliadora Parreiras Martins da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Todo o material biológico, após a extração do DNA, será descartado segundo normas da Vigilância Sanitária. Qualquer dúvida sobre a sua participação nesse estudo, por favor, entre em contato pelo telefone 3409-6937 com a Profa. Maria Auxiliadora Parreiras Martins.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, explicando a respeito do estudo sobre “Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte”.

Eu tive oportunidade de conversar sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que tenho garantia do acesso ao meu tratamento. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou do meu atendimento neste serviço.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, dou meu consentimento em participar do estudo “Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte” após ser informado sobre a pesquisa, ter entendido todos os procedimentos, tirado todas as minhas dúvidas sobre esse termo e recebido uma segunda via do mesmo.

De acordo, \_\_\_\_\_  
(assinatura)

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

Durante o estudo, caso você tenha alguma dúvida sobre os procedimentos da pesquisa, você poderá entrar em contato conosco:

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos. Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP 31270-901. Telefone: (31) 3409-6937 - (31) 9643-8625 (Profa. Maria Auxiliadora) / (31) 3409-9379 (Dr. Antônio) / (31) 9977-6773 (Dr. Manoel) / (31) 9831-0004 (Dr. Vandack)

Caso tenha alguma dúvida sobre aspectos éticos, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º. Andar – sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592

## APÊNCIDE B – Protocolo para recrutamento dos pacientes

- 1 - Data recrutamento \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 2 - Número de registro na pesquisa \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 3 - Número do prontuário \_\_\_\_\_
- 4 - Nome \_\_\_\_\_
- 5- Telefone ( ) \_\_\_\_\_
- 6 - Critérios de inclusão
- |  |         |         |
|--|---------|---------|
| Uso de varfarina por pelo menos 2 meses                    | (0) Não | (1) Sim |
| Em acompanhamento no Ambulatório AO por pelo menos 2 meses | (0) Não | (1) Sim |
| Idade igual ou superior a 18 anos                          | (0) Não | (1) Sim |
| Fibrilação atrial/flutter (qualquer tipo)*                 | (0) Não | (1) Sim |
| Prótese mecânica de válvula cardíaca (aórtica ou mitral)*  | (0) Não | (1) Sim |
| Acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi)*               | (0) Não | (1) Sim |
- \* Considerar a presença de apenas uma dessas condições como critério de inclusão
- 7 - Critérios de exclusão
- |  |         |         |
|--|---------|---------|
| Previsão de uso da varfarina por menos de 12 meses | (0) Não | (1) Sim |
|--|---------|---------|
- 8 - Paciente aceita participar após apresentação do TCLE? (0) Não (1) Sim
- 9 - Motivo de recusa \_\_\_\_\_

Responsável pelo registro de dados \_\_\_\_\_ (nome legível) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## APÊNDICE C – Protocolo para coleta de dados

- 1 - Sexo (0) M (1) F
- 2- Cor da Pele (auto-declarada) (0) Branco (1) Não Branco  
Considerar Não Branco como Amarela, Indígena, Parda, Preta, Não Soube
- 3 – RNI realizado no Ambulatório Anticoagulação (0) Não (1) Sim  
4 – RNI-alvo (0) 2,0 a 3,0 (1) 2,5 a 3,5
- 5 - Data de nascimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_
- 6 – Grau escolaridade completo
- (0) Nunca estudou  
(1) Ensino fundamental incompleto  
(2) Ensino fundamental completo  
(3) Ensino médio incompleto  
(4) Ensino médio completo  
(5) Graduação incompleta  
(6) Graduação completa  
(7) Pós-Graduação incompleta  
(8) Pós-Graduação completa  
(9) SI
- 7 - Renda mensal *per capita* (reais) \_\_\_\_\_
- 8 - Coabitação (paciente reside com uma ou mais pessoas) (0) Não (1) Sim
- 9 - Uso de bebidas alcoólicas (0) Não (1) Sim  
Em caso afirmativo, qual a quantidade utilizada?
- Cerveja: \_\_\_\_ latas/dia (1360mL ~ 4 latas/dia ou ~ 2 garrafas)
- Vinho: \_\_\_\_ copos/dia (568mL ~ 4 taças/dia)
- Destilado: \_\_\_\_ doses/dia (172mL ~ 4 doses/dia)
- \_\_\_\_\_: \_\_\_\_ doses/dia
- 10 - Uso de tabaco (Quantidade  $\geq$  a 1 cigarro último mês)  
(Considerar cigarro, charuto, cachimbo, adesivo nicotina) (0) Não (1) Sim
- 11 - Necessidade de auxílio para administração da varfarina (0) Não (1) Sim
- 12 - Varfarina disponibilizada pelo Ambulatório Anticoagulação (0) Não (1) Sim

Responsável pelo registro de dados \_\_\_\_\_ (nome legível) Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## 1 - Indicação da anticoagulação oral

Fibrilação atrial/flutter (qualquer tipo)	(0) Não	(1) Sim
Prótese mecânica de válvula cardíaca aórtica	(0) Não	(1) Sim
Prótese mecânica de válvula cardíaca mitral	(0) Não	(1) Sim
Trombose venosa profunda (TVP)	(0) Não	(1) Sim
Tromboembolismo pulmonar (TEP)	(0) Não	(1) Sim
Acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi)	(0) Não	(1) Sim
Trombo intracardíaco	(0) Não	(1) Sim
Ataque isquêmico transitório (AIT)	(0) Não	(1) Sim

## 2 - Data de início do tratamento com a varfarina \_\_\_\_\_

## 3 - Data de início acompanhamento Ambulatório Anticoagulação \_\_\_\_\_

## 4 – Comorbidades

Doença de Chagas	(0) Não	(1) Sim
Afecções dermatológicas	(0) Não	(1) Sim
Alterações oftalmológicas	(0) Não	(1) Sim
Arritmias	(0) Não	(1) Sim
Déficit auditivo	(0) Não	(1) Sim
Diabetes	(0) Não	(1) Sim
Dislipidemia	(0) Não	(1) Sim
Doença aórtica (DAO)	(0) Não	(1) Sim
Doença arterial coronariana (DAC)	(0) Não	(1) Sim
Doenças trato gastrointestinal (TGI)	(0) Não	(1) Sim
Doenças hematológicas	(0) Não	(1) Sim
Doenças infecciosas	(0) Não	(1) Sim
Doenças neuropsiquiátricas	(0) Não	(1) Sim
Doenças valvares	(0) Não	(1) Sim
Doenças vasculares periféricas (DVP)	(0) Não	(1) Sim
Doenças do endocárdio, miocárdio e pericárdio	(0) Não	(1) Sim
Doenças osteoarticulares	(0) Não	(1) Sim
Doenças respiratórias	(0) Não	(1) Sim
Doenças reumáticas	(0) Não	(1) Sim
Hipertensão arterial sistêmica (HAS) $\geq$ 140/90 mmHg	(0) Não	(1) Sim
Hipotireoidismo	(0) Não	(1) Sim
Infarto agudo do miocárdio	(0) Não	(1) Sim
Insuficiência cardíaca	(0) Não	(1) Sim
Insuficiência hepática	(0) Não	(1) Sim
insuficiência renal	(0) Não	(1) Sim
Neoplasias	(0) Não	(1) Sim
Obesidade	(0) Não	(1) Sim
Placa aórtica	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças da tireoide	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças do trato geniturinário	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças hepáticas	(0) Não	(1) Sim

5 - Medicamentos em uso crônico ( $\geq$  30 dias contínuos)

Amiodarona	(0) Não	(1) Sim
Sinvastatina	(0) Não	(1) Sim
Hidroclorotiazida	(0) Não	(1) Sim
Furosemida	(0) Não	(1) Sim
Enalapril	(0) Não	(1) Sim
Captopril	(0) Não	(1) Sim
Losartana	(0) Não	(1) Sim
Propranolol	(0) Não	(1) Sim
Carvedilol	(0) Não	(1) Sim
Metoprolol	(0) Não	(1) Sim
Espironolactona	(0) Não	(1) Sim
Digoxina	(0) Não	(1) Sim
Ácido acetilsalicílico 100 mg	(0) Não	(1) Sim
Alopurinol	(0) Não	(1) Sim
Levotiroxina	(0) Não	(1) Sim
Outro _____		

## 6 – Número de medicamentos em uso crônico (incluindo a varfarina) \_\_\_\_\_



**7 – Hemorragia maior**

Sangramento clinicamente evidente associado com:

Diminuição hemoglobina $\geq 2$ g/dL	(0) Não	(1) Sim
Transfusão de $\geq 2$ UI de hemácias ou sangue total	(0) Não	(1) Sim
Intra-articular	(0) Não	(1) Sim
Intracraniano	(0) Não	(1) Sim
Intra-espinhal	(0) Não	(1) Sim
Intramuscular com síndrome do compartimento	(0) Não	(1) Sim
Intraocular	(0) Não	(1) Sim
Pericárdico	(0) Não	(1) Sim
Retro peritoneal	(0) Não	(1) Sim
Morte	(0) Não	(1) Sim
Número de eventos (total) _____		

**8 – Hemorragia não maior clinicamente relevante**

(não se enquadram em sangramento maior, mas associado com intervenção médica, desconforto como dor ou comprometimento das atividades diárias do paciente )

Epistaxe (Duração > 5 min; $\geq 2$ episódios dentro 24 horas, necessidade intervenção médica como estancamento, cauterização etc.)	(0) Não	(1) Sim
Gaстрintestinal macroscópica ( $\geq 1$ episódio de melena ou hematêmese clinicamente aparente)	(0) Não	(1) Sim
Gengival espontâneo (Duração > 5 min não relacionado a escovação ou alimentação)	(0) Não	(1) Sim
Hematoma intramuscular	(0) Não	(1) Sim
Hematoma subcutâneo (> 25 cm <sup>2</sup> ou > 100 cm <sup>2</sup> se provocado)	(0) Não	(1) Sim
Hematúria macroscópica ou espontânea (duração > 24 horas após instrumentação do trato urogenital como troca cateter ou cirurgia)	(0) Não	(1) Sim
Hemoptise (identificado por manchas de sangue no escarro)	(0) Não	(1) Sim
Sangramento retal	(0) Não	(1) Sim
Fontes múltiplas sangramento	(0) Não	(1) Sim
Número de eventos (total) _____		

**9 - Hemorragia menor**

(todos os outros não encontrados nos critérios de sangramento maior e não maior clinicamente relevante)

Outra \_\_\_\_\_  
 Outra \_\_\_\_\_

Número de eventos (total) \_\_\_\_\_

**10 - Tromboembolismo**

Acidente vascular cerebral isquêmico	(0) Não	(1) Sim
Tromboembolismo pulmonar	(0) Não	(1) Sim
Trombose venosa profunda	(0) Não	(1) Sim
Tromboembolismo intracardiaco	(0) Não	(1) Sim
Tromboembolismo sistêmico	(0) Não	(1) Sim
Hospitalização devido ao evento tromboembólico	(0) Não	(1) Sim
Outra _____		

Número de eventos (total) \_\_\_\_\_

## 11 – Genotipagem

Genótipo VKORC1 G1639A

- (0) GG
- (1) GA
- (2) AA

Genótipos CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3

- (0) \*1\*1
- (1) \*1\*2
- (2) \*1\*3
- (3) \*2\*2
- (4) \*2\*3
- (5) \*3\*3

Genótipo MDR1 C3435T

- (0) CC
- (1) CT
- (2) TT

Responsável pelo registro de dados \_\_\_\_\_ (nome legível) Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**APÊNDICE D – Aceite para apresentação dos resultados parciais em  
evento científico internacional**

Dear Maria Martins,

Thank you for submitting an abstract to the 64<sup>th</sup> Annual Scientific and Standardization Committee Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis taking place in Dublin, Ireland from July 18 – 21, 2018.

On behalf of the Scientific Program Committee we are pleased to inform you that the following abstract has been **accepted** for a **Poster Presentation**. This decision was based on the reviews by several experts in the field who assessed the scientific value of the contents and its suitability for this meeting.

In addition due to the overwhelming amount of quality submissions we regret to inform you that you have not been selected to receive a Travel Grant. We do however look forward to your participation at the meeting and hope you are able to secure another source of funding.

**Title:** Weekly warfarin maintenance dose according to variations in four genes evaluated in patients assisted at a Brazilian anticoagulation clinic

In addition your abstract has been renumbered and the new program number is:

**Abstract Presentation Number:** PB473

**Poster Session:** Poster Session #2: Please hang your poster beginning at 13:15 on Thursday, July 19

**Poster Location:** Liffey B

Emílio Itamar de Freitas Campos, RPh, MSc<sup>1</sup>, Karina Braga Gomes Borges, RPh, PhD<sup>2</sup>, Aline de Oliveira Magalhães Mourão, RPh, PhD<sup>1</sup>, Manoel Otávio da Costa Rocha, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Daniel Dias Ribeiro, MD, PhD<sup>3</sup>, María Auxiliadora Parreiras Martins, RPh, PhD<sup>1,2,3\*</sup>

\*auxiliadorapmartins@hotmail.com

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil.

<sup>3</sup>Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 110, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais 31130-100, Brazil.



## INTRODUCTION

Warfarin is an oral anticoagulant used to treat and prevent thromboembolism. There is evidence that genetic variations on CYP2C9, VKORC1, MDR1 and APOE genes affect warfarin dose and it can be associated with drug sensitivity or resistance.

**Aim:** To compare weekly warfarin maintenance dose for CYP2C9, VKORC1, MDR1 and APOE genotypes.

## METHODS

This was a cross-sectional study, performed in 2015 at an anticoagulation clinic of a Brazilian university hospital. Polymorphisms \*1, \*2 and \*3 for CYP2C9 gene, -1639 G>A for VKORC1 gene, 3435 C>T for MDR1 and \*ε2, \*ε3 and \*ε4 for APOE were genotyped using Real-Time PCR. We collected data through patient interviews and medical chart review. Weekly warfarin maintenance dose was obtained from the hospital computerized system. Descriptive statistical methods were used for data evaluation. The comparison of weekly warfarin dose and genotypes was performed using ANOVA and a significance level of 0.05. This project was approved by the University Ethics Committee (code number CAAE/08136613.4.0000.5149). All participants signed an informed consent.

## RESULTS

Evaluating the 136 study participants, mean age was 60.1±13.6 years and 78 (57.4%) were female. The main indication for warfarin use was atrial fibrillation (n = 98; 72.1%). The presence of polymorphic allele (A) in VKORC1 and at least one polymorphic allele (\*2 and/or \*3) in CYP2C9 was associated with a reduced weekly warfarin maintenance dose (p<0.001). Conversely, the presence of \*ε2 and/or \*ε4 polymorphic alleles in APOE and polymorphic allele (T) in MDR1 was not associated with statistically significant dose modification (Table 1).

Table 1: Doses stratification by genotype (n = 136)

Genes	Genotypes (n)	Dose/week	Anova (p value)
VKORC1	GG (66)	37,5±16,4	
	GA (51)	26,5±10,4	<0,001
	AA (19)	17,0±6,2	<0,001
CYP2C9	*1*1 (95)	33,8±15,4	
	*1*2 (23)	25,4±14,0	0,0189
	*1*3 (12)	21,0±6,6	0,0056
	*2*2 (3)	16,9±8,2	0,0630
	*2*3 (3)	16,7±2,7	0,0587
	At least one polymorphic allele (*2 and/or *3) (41)	22,9±11,6	<0,001
APOE	*ε3*ε3 (84)	31,9±16,3	
	*ε2*ε3 (16)	26,6±11,2	0,2164
	*ε2*ε4 (1)	34,6	0,8705
	*ε3*ε4 (33)	28,3±14,2	0,2709
	*ε4*ε4 (2)	36,2±5,3	0,7159
MDR1	CC (55)	33,0±15,8	
	CT (57)	28,3±12,5	0,0796
	TT (24)	29,9±18,9	0,4571

## CONCLUSIONS

Only CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influenced weekly warfarin maintenance dose requirements in the studied population. The knowledge of patient genotypes can help achieve more accurate dose adjustments and bring more quality to the treatment of patients using warfarin.

## REFERENCES

- BOTTON, M. R. *et al.* Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br J Clin Pharmacol*, v. 72, n. 3, p. 442-50, 2011.
- DE OLIVEIRA ALMEIDA, V. C. *et 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*, v. 18, n. 6, p. 675-83, 2014.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study has the financial support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG (Foundation for Research Support of Minas Gerais).

**Disclosure:** The authors declare no conflict of interest.

