

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS E A DOSE TERAPÊUTICA DA
VARFARINA EM PACIENTES COM
TROMBOSE: UM ESTUDO DE COORTE

ORIENTADA: Vanessa Cristina de Oliveira Almeida

ORIENTADORA: Ana Lúcia Brunialti Godard

CO-ORIENTADORA: Karina Braga Gomes Borges

Belo Horizonte - MG

2014

VANESSA CRISTINA DE OLIVEIRA ALMEIDA

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS E A DOSE TERAPÊUTICA DA
VARFARINA EM PACIENTES COM
TROMBOSE: UM ESTUDO DE COORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a. Karina Braga Gomes Borges

Belo Horizonte - MG

2014

II

Doutoranda: Vanessa Cristina de Oliveira Almeida

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Braga Gomes Borges

Colaboradores: Dr. Daniel Dias Ribeiro

Prof^a Dr^a Ana Paula Salles Moura Fernandes

Linha de Pesquisa

Bases Moleculares de Patologias Humanas

Área de Conhecimento

Genética

Instituições participantes

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Hermes Pardini

Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas – UFMG

Faculdade de Farmácia - UFMG

Dedico este trabalho a meus pais, Antônio e Solange, que sempre me apoiaram nas minhas decisões, incentivando-me a buscar, com ética e respeito, os passos certos para um caminho melhor. Obrigada pela confiança, pela vida e por todas as oportunidades.

Dedico ao meu marido, Rodrigo, pelo carinho, companheirismo, apoio e conselhos, presentes em todos os momentos. Obrigada por todas palavras e gestos de carinho e por estar sempre ao meu lado, me guiando para o próximo desafio.

Dedico ao grupo de pacientes do Ambulatório de Hematologia que fizeram parte deste estudo. O maior aprendizado que obtive neste trabalho foi a convivência com vocês, que com sua humildade e simplicidade, traduziram páginas e páginas de livros em vida real.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho, todos vocês foram muito especiais:

A Deus, pela presença constante em minha vida, dando-me força e paciência para enfrentar os momentos mais críticos desta caminhada. Agradeço por ter colocado no meu caminho tantas *peessoas-anjos* que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, por me incentivar e me mostrar a importância do conhecimento. Agradeço a recepção calorosa em seu laboratório, a orientação e dedicação na realização deste trabalho. Sua confiança e apoio foram de suma importância para meu desenvolvimento.

À Dra. Karina Braga Gomes Borges, pela dedicação e pela contribuição imensurável neste trabalho e em todos momentos da minha caminhada. A sua contribuição foi fundamental na viabilização deste trabalho e é um exemplo de dedicação, apoio, liderança, paciência e carinho.

Ao Dr. Daniel Dias Ribeiro, por me receber carinhosamente em seus locais de trabalho e por ter me confiado seus queridos pacientes. Agradeço por ter intermediado um dos grandes ensinamentos deste trabalho: o valor à vida. Muito além das aulas que recebi, aprendi como é importante poder contar com os outros.

Ao Dr. Alessandro Clayton Souza Ferreira, por incentivar-me sempre a buscar o Conhecimento. Agradeço por ter sido o responsável pelos primeiros passos deste trabalho e pelo apoio durante todo este percurso.

À Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, pela disponibilidade e pela confiança ao nos ceder o banco de pacientes.

Aos pacientes, que contribuíram voluntariamente com este estudo. Agradeço a confiança e os grandes ensinamentos em cada uma de nossas conversas. Além de me mostrarem na prática o que é a Farmacogenética, me mostraram vários significados de vida.

Ao Instituto Hermes Pardini, pela oportunidade, confiança e patrocínio deste trabalho; e apoio na conciliação de estudos e trabalhos. Obrigada por todas oportunidades para meu crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos colegas do Departamento de Genética Molecular do Hermes Pardini, pela colaboração, amizade e alegrias proporcionadas. Agradeço pelo incentivo e por tudo que me ensinaram e me ensinam todos os dias. Vocês são especiais!

À querida estagiária Juliana Chagas, pela contribuição valiosa e cuidado especial com este trabalho.

À Pós-Graduação em Genética, pela atenção e contribuição para a continuidade e conclusão deste trabalho.

A todos vocês, que contribuíram diretamente e indiretamente para este trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XI
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO E RELEVANCIA	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 ANTICOAGULAÇÃO	5
2.1.1 Hemostasia	5
2.1.2 Monitoramento da terapia anticoagulante	5
2.1.3 Indicações	7
2.2 VARFARINA	8
2.2.1 Apresentação química e comercial	8
2.2.2 Farmacodinâmica.....	8
2.2.3 Farmacocinética	10
2.2.4 Reações adversas e toxicidade	11
2.2.5 Interações farmacológicas e não farmacológicas	12
2.2.6 Resistência à varfarina.....	14
2.3 FARMACOGENÉTICA DA VARFARINA.....	14
2.3.1 Farmacogenética e Farmacogenômica	14
2.3.2 Farmacogenética da varfarina.....	15
2.3.3 Genes relacionados	18
2.3.3.1 Gene CYP2C9	18
2.3.3.2 Gene VKORC1	19
a) Polimorfismos relacionados às variações das doses de varfarina	20
b) Mutações de resistência à varfarina.....	21

2.3.3.3 Gene MDR1	24
2.3.3.4 Gene APOE	25
2.3.3.5 Gene UGT1A1	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 CAPITULOS	29
4.1 Capítulo 1	29
4.2 Capítulo 2	33
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	49
7 PERSPECTIVAS	50
8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
9 ANEXOS	59
9.1 Ficha Clínica.....	59
9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
9.3 Parecer ETIC 334/08.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ação da varfarina.	9
Figura 2: Representação esquemática do metabolismo da varfarina.	11
Figura 3: Interação entre o fármaco varfarina e 29 produtos gênicos envolvidos em várias etapas do processamento deste fármaco no organismo.	18
Figura 4: Modelo de topológico humano da proteína VKORC1, a partir da análise de bioinformática de ortólogos de VKORC1 em 327 espécies.	23

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de classes farmacológicas de fármacos que constituem risco potencial de interação com varfarina, como ação antagonista ou potencializadora. 1613

Quadro 2: Recomendações aprovadas pelo FDA e inseridas na bula do medicamento Coumadin® sobre as doses diárias de varfarina (mg/dia) para alcançar um RNI terapêutico, baseadas nos genótipos de CYP2C9 e VKORC1. 1616

Quadro 03: Lista de mutações descritas em *VKORC1*. **Erro! Indicador não definido.**22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC - *ATP-binding cassette*

ABCB1 - *ATP-binding cassette, subfamily b, member 1*

APOE – Apolipoproteína E

CALU – Calumenina

CO₂ - Gás carbônico

CPIC - *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CYP2C9 - *Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9*

EP – Embolismo pulmonar

FDA - *Food and Drug Administration*

FII - Fator II

FV - Fator V

FVL - Fator V de Leiden

GGCX - *γ-glutamyl carboxilase*

IMC - Índice de Massa Corporal

IWPC - *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*

MDR1 - *Multidrug-resistant transporter-1*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MTP - Mutação G20210A da protrombina

O₂ - Oxigênio

PCa – Proteína C ativada

PGP – Glicoproteína P

Q - Glutamina

R - Arginina

RE - Retículo endoplasmático

RNI - Razão Normalizada Internacional

RPCA - Resistência à Proteína C ativada

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*

SUS – Sistema Único de Saúde

TEV - Tromboembolismo venoso

TV - Trombose venosa

TVP - Trombose venosa profunda

VKH₂ - Vitamina K reduzida

TA – Timina-adenina

TM - Transmembrana

TP - Tempo de Protrombina

TVP - Trombose venosa profunda

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UGTs - Uridina-difosfato-glicuronosiltransferases

UGT1A1 - *UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1*

VKORC1 - *Vitamina K epoxido-redutase complexo 1*

RESUMO

Os tratamentos preventivos de doenças tromboembólicas objetivam manter uma anticoagulação estável e individualizada, para os quais o anticoagulante varfarina é o tratamento de escolha. A influência de inúmeros fatores sobre a ação da varfarina resulta em uma ampla variabilidade de resposta à mesma, cuja monitorização e ajuste de dose adequada requerem conhecimento aprofundado destes fatores. O objetivo deste trabalho foi investigar a associação dos polimorfismos *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3, -1639G>A de *VKORC1*, 3435C>T de *MDR1*, *APOE* *ε4 e *UGT1A1*(TA)₇ com a dose de varfarina requerida por 116 indivíduos em terapia anticoagulante. Observou-se que 20,7% dos pacientes apresentaram requerimentos de varfarina semanais superiores a 70 mg e, portanto, resistência à varfarina. O IMC, o uso de antagonistas de varfarina e os genótipos 3435TT de *MDR1* e *UGT1A1*(TA)_{7/7} mostraram-se relacionados à necessidade de maiores doses de varfarina para se alcançar a anticoagulação terapêutica adequada; podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência à varfarina. Em contrapartida, o aumento de idade, a presença das variantes *2 e *3 de *CYP2C9*, -1639A de *VKORC1* e o alelo ε4 de *APOE* contribuem para doses menores de varfarina. Estes resultados evidenciaram que fatores genéticos podem influenciar a variabilidade de dose de varfarina na população estudada e que devem ser investigados a fim de melhor adequar o tratamento anticoagulante.

Palavras-chave: Varfarina, Resistência, Farmacogenética, *CYP2C9*, *VKORC1*, *APOE*, *MDR1*, *UGT1A1*.

ABSTRACT

The treatment of thromboembolic diseases aims to maintain a stable and personalized anticoagulation, for which the warfarin anticoagulant is the treatment of choice. The influence of several factors on the action of warfarin results in a wide variability in the patient's response, and monitoring and appropriate dose adjustment require depth knowledge of these factors. The aim of this study was to investigate the association of polymorphisms *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3*, *-1639G>A VKORC1*, *3435C>T MDR1*, *APOE*ε4* and *UGT1A1(TA)_{7/7}* with the dose of warfarin required by 116 individuals in therapy anticoagulant. We observed that 20.7% of patients demonstrated requirements over 70 mg/week warfarin and, thus, they were resistant to warfarin. The BMI, the use of warfarin antagonists and *3435TT MDR1* and *UGT1A1(TA)_{7/7}* genotypes showed relationship with higher warfarin doses to achieve adequate anticoagulation therapy; which may contribute to the development of warfarin resistance. In contrast, increasing age, the *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* variants, *-1639A VKORC1* and *APOE*ε4* allele contribute to lower warfarin dose requirements. These results show that genetic factors may influence the variability in warfarin dose in this population and should be investigated in order to better adapt the anticoagulant treatment.

Keywords: Warfarin, Resistance, Pharmacogenetic, *CYP2C9*, *VKORC1*, *APOE*, *MDR1*, *UGT1A1*.

1 INTRODUÇÃO E RELEVANCIA

O principal objetivo dos tratamentos preventivos de doenças tromboembólicas é manter uma anticoagulação estável e individualizada, para as quais o anticoagulante varfarina é o tratamento de escolha. No entanto, segundo declaração do *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 2007, um terço dos pacientes em terapia anticoagulante com varfarina a metaboliza inadequadamente, gerando riscos de hemorragias e de hipercoagulabilidade. Indivíduos que recebem doses maiores que as necessárias à anticoagulação apresentam grande risco de hemorragia, enquanto aqueles tratados com doses menores que a adequada permanecem em risco de tromboembolismo.

A efetividade e segurança da terapia com varfarina exige a monitorização laboratorial periódica da sua ação farmacológica, que é realizada através da Razão Normalizada Internacional (RNI), cujo valor indica a necessidade ou não de ajuste da dosagem do anticoagulante. Isso se justifica pelo fato da varfarina apresentar uma ampla variação interindividual farmacocinética e farmacodinâmica e uma estreita janela terapêutica, o que complica a sua empregabilidade e eficácia:

A variação interindividual da dose de varfarina necessária para atingir o objetivo terapêutico é dependente de inúmeros fatores não-genéticos e genéticos. Idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), co-morbidades, interações farmacológicas e nível de ingestão de vitamina K são as principais influências não-genéticas da dosagem de varfarina. Em caucasianos, 30 a 50% da variabilidade da dose de varfarina são atribuídas a polimorfismos nos genes *CYP2C9* e *VKORC1*, respectivamente, responsáveis pelo *clearance* metabólico e pela ação farmacodinâmica da varfarina. Quando em homozigose, os alelos *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 do gene *CYP2C9* e a variante -1639A do gene *VKORC1* têm sido associados à ocorrência de sensibilidade à varfarina, na qual a dose requerida tende a ser menor e o risco de anticoagulação excessiva tende a ser maior. As variantes alélicas de *CYP2C9* e *VKORC1* também podem influenciar a estabilidade da anticoagulação. Outros genes de potencial importância para a resposta à varfarina, como *CYP4F2*, *CALU*, *GGCX*, *MDR1* e *APOE*, também têm sido estudados, mas com resultados ainda inconclusivos. Por último, vale destacar o gene *UGT1A1*, tendo os primeiros estudos relacionados à varfarina em 2012.

Por outro lado, alguns pacientes em terapia anticoagulante requerem doses de varfarina superiores às doses normalmente recomendadas e, nestes casos, se a administração de varfarina é inferior à necessária, o risco de tromboembolismo permanece. Seja de origem hereditária ou adquirida, mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos

são sugeridos para explicar este fato, denominado resistência à varfarina. Esta é definida como a incapacidade do anticoagulante gerar níveis adequados de anticoagulação, medidos através do tempo de protrombina, quando administrado com uma dose próxima ou equivalente às doses normalmente recomendadas. Trabalhos anteriores consideram que nos casos de resistência, o requerimento de varfarina é superior a 70mg/ semana para a obtenção de RNI na faixa terapêutica ou o RNI alvo não é alcançado.

Com o objetivo de buscar conhecimentos adicionais que possam contribuir para um melhor entendimento dos fatores que ocasionam a variabilidade interindividual das respostas à varfarina, este estudo analisou a variação de dose deste medicamento em relação a diversas variáveis genéticas e adquiridas, em um grupo de pacientes com tromboembolismo, em terapia anticoagulante com varfarina e acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os resultados obtidos neste estudo serão de grande valia para o melhor conhecimento da farmacogenética da varfarina na população brasileira com tromboembolismo, pois apresentarão a relação existente entre as doses de varfarina requeridas na terapia anticoagulante e os genes *VKORC1*, *CYP2C9*, *APOE*, *MDR1* e *UGT1A1*, em uma amostra representativa de indivíduos que fazem uso deste anticoagulante em Minas Gerais. Este trabalho é, provavelmente, o primeiro estudo do conjunto de polimorfismos relacionados acima na população com tromboembolismo venoso em Minas Gerais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTICOAGULAÇÃO

2.1.1 Hemostasia

A hemostasia consiste em uma seqüência de eventos fisiológicos integrados, nos quais uma variedade de substâncias se interrelacionam, de maneira equilibrada e dinâmica, visando garantir a circulação do sangue no estado fluido dentro do espaço vascular. O processo hemostático envolve interação entre o endotélio vascular, proteínas da coagulação e da fibrinólise, plaquetas e anticoagulantes naturais (Zago *et al.*, 2001).

Em condições fisiológicas, as reações envolvidas na hemostasia resultam em produção equilibrada de quantidades apropriadas de trombina e do coágulo de fibrina, em resposta adequada e proporcional à lesão vascular existente. O comprometimento do equilíbrio hemostático, por ação de fatores adquiridos ou congênitos, pode propiciar o desenvolvimento de fenômenos de hipercoagulabilidade ou de hipocoagulabilidade. Portanto, as reações bioquímicas da coagulação do sangue requerem uma estrita regulação a fim de gerarem, tanto quantitativa como qualitativamente, uma adequada e oportuna ativação e inativação dos sistemas da coagulação e da fibrinólise. Apesar do uso de medidas profiláticas, a morbidade e a mortalidade relacionadas aos distúrbios hemostáticos são significativas, principalmente pelo seu aparecimento súbito e a difícil valoração dos múltiplos fatores causais envolvidos nestes processos (Lorenzi *et al.*, 2003).

2.1.2 Monitoramento da terapia anticoagulante

Como a ação farmacológica dos anticoagulantes provoca alteração da hemostasia e a farmacocinética destes medicamentos é alterada por muitos fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo, há a necessidade de monitorar, cuidadosamente, o efeito dos mesmos, para manter um nível ideal de anticoagulação e obter um efeito antitrombótico, sem aumentar o risco de hemorragia (Maffei *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006). Para que isto seja possível, é preciso realizar constantemente a otimização do controle individualizado da anticoagulação e a educação dos pacientes quanto ao tratamento (Jacobson *et al.*, 2007). Desde 1960, a heparina e a varfarina são os principais fármacos empregados na terapia anticoagulante, sendo a primeira para tratamento imediato e a segunda para tratamentos a longo prazo para prevenção de recorrências (Schafer *et al.*, 2003). Por apresentarem

limitações e riscos particulares, estes fármacos não são considerados anticoagulantes ideais. Neste sentido, tem se estimulado a pesquisa de novos fármacos, que se aproximem o máximo possível de um anticoagulante ideal, como por exemplo, dabigatrana e rivaroxaban (Prasad *et al.*, 2012).

O Tempo de Protrombina (TP) é um teste de coagulação amplamente utilizado para monitorar a terapia com anticoagulantes orais e para triagem de deficiências nos fatores da coagulação II, V, VII e X (Smith *et al.*, 2004). O TP avalia o tempo gasto para formação do coágulo em um plasma citratado na presença de cálcio e fator tissular (tromboplastina) adicionado em excesso, e tem a capacidade de refletir a depressão dos fatores da coagulação II, VII, IX e X, dependentes da vitamina K (Zago *et al.*, 2001).

O teste original foi desenvolvido por Quick em 1935, apresentando algumas limitações. A principal dificuldade no uso do TP para o controle terapêutico dos anticoagulantes orais é o grau de variação na sensibilidade apresentada por diferentes tromboplastinas comerciais à redução dos fatores da coagulação induzida pelo anticoagulante, sensibilidade esta que depende do método de preparação desse reagente. Com a finalidade de corrigir as diferenças na sensibilidade das tromboplastinas, em 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) designou um lote de tromboplastina de cérebro humano como referência internacional (Zago *et al.*, 2001). A partir desta preparação, todos os fabricantes de tromboplastinas devem estabelecer para cada lote, o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), que compara a atividade da nova tromboplastina em relação à preparação referência. O valor do ISI da tromboplastina reagente é usado para calcular o RNI do plasmas dos pacientes. O RNI é calculado dividindo o valor do TP do paciente pelo valor médio de TP de 20 ou mais plasmas normais. Essa razão é elevada ao ISI, produzindo um valor de RNI que é então usado para monitorar a terapia com anticoagulantes orais (Hirsh *et al.*, 1995).

Inicialmente, o monitoramento da varfarina deve ser realizado diariamente até que os resultados de TP e RNI estejam estáveis e na faixa desejável, permitindo estabelecer a dosagem adequada da varfarina. Os intervalos posteriores para avaliação baseiam-se na clínica e na resposta farmacológica de cada paciente ao anticoagulante, os quais variam normalmente de uma a quatro semanas. Um fator essencial para o sucesso da terapia anticoagulante é a conscientização do paciente quanto às bases da anticoagulação, risco-benefício, importância da aderência à terapia, interações farmacológicas e não farmacológicas, monitorização laboratorial e cuidados essenciais nas diversas situações cotidianas. Para a prevenção das doenças tromboembólicas e suas recorrências, a terapia anticoagulante com varfarina é recomendada, cuja ação está sujeita à variabilidade conforme a duração e intensidade do tratamento e as influências genéticas e ambientais

(Schafer *et al.*, 2003). O valor de RNI desejado para a maioria das indicações clínicas é de 2,5, variando de 2,0 a 3,0 (Rizzatti *et al.*, 2001). Isto inclui tratamento e profilaxia da trombose venosa profunda, embolismo pulmonar e cardiopatias, como fibrilação atrial, disfunção sistólica ventricular direita, trombose mural e os três primeiros meses após infarto do miocárdio (Hirsh *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 2007). Outros valores alvos de RNI são recomendados em indicações específicas de anticoagulação.

2.1.3 Indicações

Segundo Santos *et al.* (2006), o emprego dos antagonistas da vitamina K tem importância clínica bem fundamentada em diversas situações:

- Profilaxia e tratamento de trombose venosa (TV) e embolismo pulmonar (EP) e de suas recorrências, principalmente após um curso inicial de heparina.
- Profilaxia e tratamento de complicações tromboembólicas associadas a cirurgias, fibrilação atrial, cardiomiopatias, próteses de válvulas cardíacas e embolismo sistêmico,
- Redução do risco de morte, recorrência de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e demais eventos tromboembólicos.
- Tratamento de trombose arterial em pacientes com fatores de risco associados.

Em adição, atualmente são conhecidas uma série de condições que justificam o uso da varfarina de forma constante ou até a remoção da causa do trombo: história familiar, trombose venosa em paciente jovem, malignidades, infecções crônicas, doença inflamatória intestinal, síndrome nefrótica, hipertensão pulmonar tromboembólica, e alterações genéticas, como mutação do Fator V Leiden (FVL), deficiência de proteína S e deficiência de antitrombina III (Lorenzi *et al.*, 2003).

A trombose venosa, uma doença crônica, multifatorial, multigênica e sistêmica, (Schafer *et al.*, 2003) caracteriza-se pela formação aguda de um trombo no interior de uma veia, especialmente em vasos profundos (Zago *et al.*, 2001). A partir de dados de internações do Sistema Único de Saúde (SUS), foram estimadas no Brasil cerca de 28 mil hospitalizações por embolia pulmonar com 4.247 mortes por ano (Rollo *et al.*, 2006). O tromboembolismo venoso (TEV) afeta de 1 a 3 indivíduos por mil habitantes/ano e é estimado que 60% da predisposição à trombose seja atribuída aos componentes genéticos. A incidência de TEV aumenta significativamente com a idade (Sabino, 2005). Em crianças, a ocorrência é de 1 episódio para 100.000 indivíduos/ano, enquanto no idoso a frequência pode chegar a 1%. Nos doentes clínicos, o TEV está associado ao infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca congestiva, podendo afetar

mais de 50% dessa população. A embolia pulmonar fatal é a complicação mais temida do TEV podendo atingir de 1 a 2% dos doentes (Paschôa, 2006), os quais apresentam cerca de quatro vezes mais chance de morte por recorrência de TEV que pacientes com trombose venosa profunda (TVP) isolada (Cabral *et al.*, 2004).

2.2 VARFARINA

2.2.1 Apresentação química e comercial

A varfarina sódica consiste em uma mistura racêmica com quantidades aproximadamente iguais dos dois isômeros ópticos R e S, cuja fórmula empírica é $C_{19}H_{15}NaO_4$. É o anticoagulante oral mais amplamente empregado na prática clínica em todo o mundo (Rieder *et al.*, 2005; *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*, 2009); sendo estimado que, anualmente, a varfarina seja prescrita para 0,5 a 1,5% da população mundial (Johnson *et al.*, 2011). No mercado farmacêutico brasileiro, o anticoagulante varfarina está disponível nas seguintes apresentações comerciais: Coumadin[®], Marevan[®], Marfarim[®], Varfarina sódica[®] e Warfarin[®]. Estima-se que anualmente, a varfarina seja prescrita para 0,5 a 1,5% da população mundial (Johnson *et al.*, 2011).

2.2.2 Farmacodinâmica

Os anticoagulantes orais são antagonistas da vitamina K, por inibirem a síntese dos fatores da coagulação VII e IX e das proteínas da coagulação C e S e diminuírem a atividade dos fatores II e X, sendo todos os seis dependentes de vitamina K. O seu mecanismo de ação ocorre através da interferência na interconversão ácida da vitamina K e seu 2,3 epóxido (Brunton *et al.*, 2011).

Em suma, a varfarina exerce sua ação anticoagulante ao inibir seu alvo molecular, a proteína vitamina K epóxido-redutase complexo 1 (VKORC1), que por sua vez, restringe a quantidade de vitamina K reduzida. Conseqüentemente, há redução da produção de fatores da coagulação funcionalmente ativos; sendo, portanto, prescrita para tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas (Johnson, *et al.*, 2011).

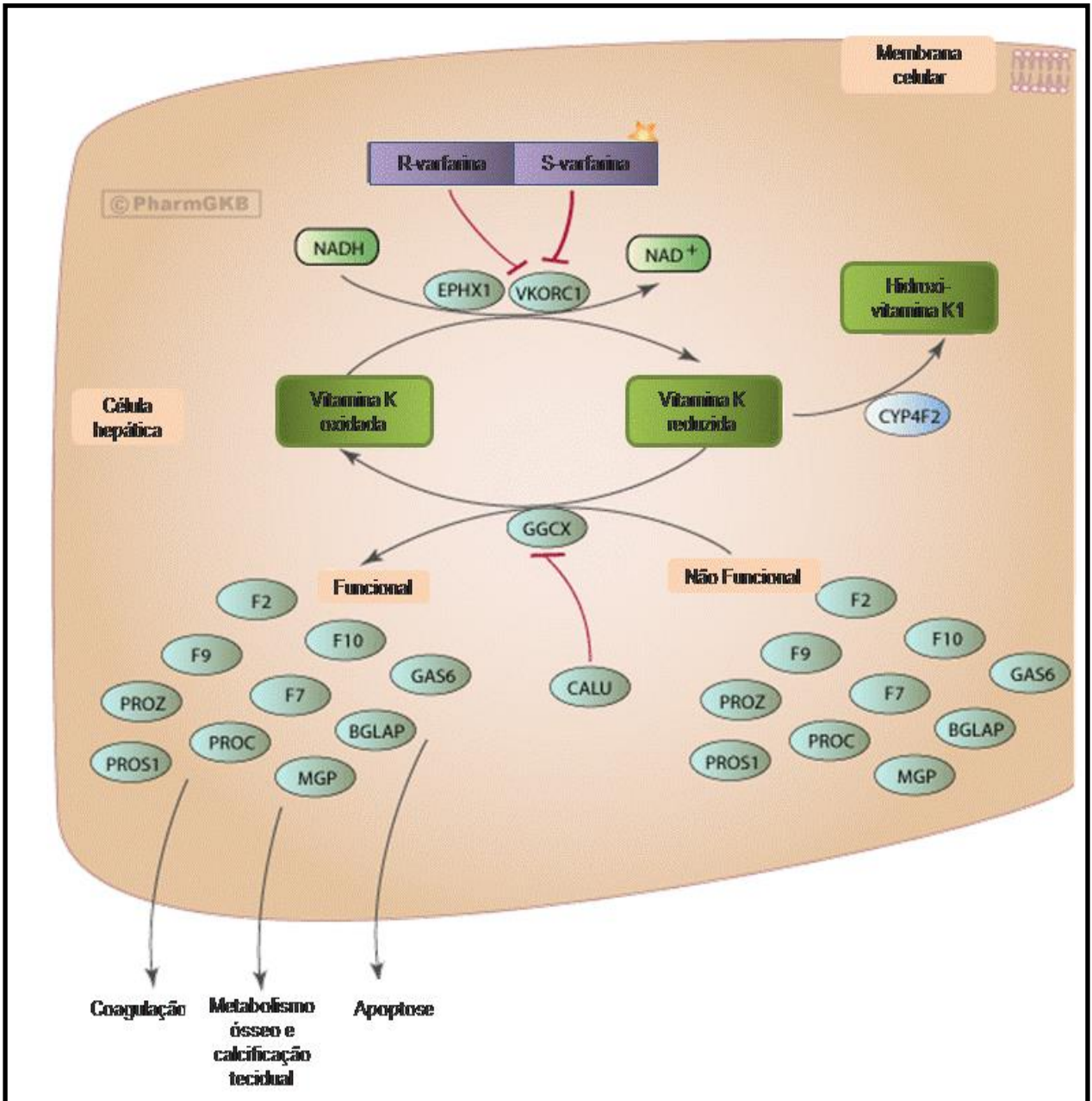


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ação da varfarina. Fonte: PharmGKB: Pathway - Warfarin Pathway, Pharmacodynamics de < <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011114>>.

Fisiologicamente, para que esses fatores se tornem biologicamente ativos, é necessário que ocorra a gama-carboxilação de seus resíduos de ácido glutâmico, pela proteína γ -glutamil carboxilase (GGCX), o que lhes confere a capacidade de ligação ao Ca^{2+} , processo essencial para ativação da coagulação (Tondato *et al.*, 2004). Esta reação de carboxilação ocorre no retículo endoplasmático rugoso e exige a presença de gás carbônico (CO_2), oxigênio (O_2), vitamina K reduzida (VKH_2) e um precursor de alguma proteína da coagulação dependente de vitamina K (Brunton *et al.*, 2011). Esta etapa pós-

ribossomal de biosíntese de resíduos ácido-carboxiglutâmicos é promovida pela forma reduzida da vitamina K. Durante esse processo, VKH₂ é oxidada à vitamina K epóxido e, a seguir, retorna à forma reduzida pela ação das redutases vitamina K redutase e vitamina K epóxido redutase, completando o chamado ciclo da vitamina K, conforme **figura 1**. O processo de gama-carboxilação é regulado pela proteína calumenina (CALU), que ao se ligar à GGcX, inibe a atividade desta (Brunton *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2011).

As doses terapêuticas de varfarina inibem 30 a 50% da produção hepática de fatores da coagulação dependentes da vitamina K, sem seletividade sobre estes. Em adição, os 50 a 70% dos fatores produzidos estão subcarboxilados, fato este que reduz a atividade biológica coagulante em 10 a 40% (Brunton *et al.*, 2011).

2.2.3 Farmacocinética

A varfarina é absorvida completamente após administração oral, intramuscular, intravenosa ou retal. Os enantiômeros R e S têm biodisponibilidade semelhantes. A presença de alimento no estômago pode prejudicar a taxa de absorção. A varfarina pode ser detectada no plasma cerca de uma hora após a administração oral, sendo o pico de concentração em 2 a 8 horas. Aproximadamente 97% do medicamento estão ligados à albumina plasmática, distribuindo-se ampla e rapidamente em todos os tecidos (Brunton *et al.*, 2011).

A S-varfarina é 3 a 5 vezes mais potente na inibição de VKORC1 que a R-varfarina. Os dois enantiômeros são metabolizados por duas vias diferentes, sendo o isômero S via CYP2C9 e o isômero R, via principalmente, CYP3A4, mas também pelos CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19 (PharmGKB: Pathway, 2011), conforme visto na **figura 2**. O metabolismo de fase II ainda não é bem elucidado, mas deve envolver conjugação com grupos sulfato e glicuronil. A eliminação é predominantemente renal, mas também há evidências de transporte hepático via MDR1 (PharmGKB: Pathway, 2011).

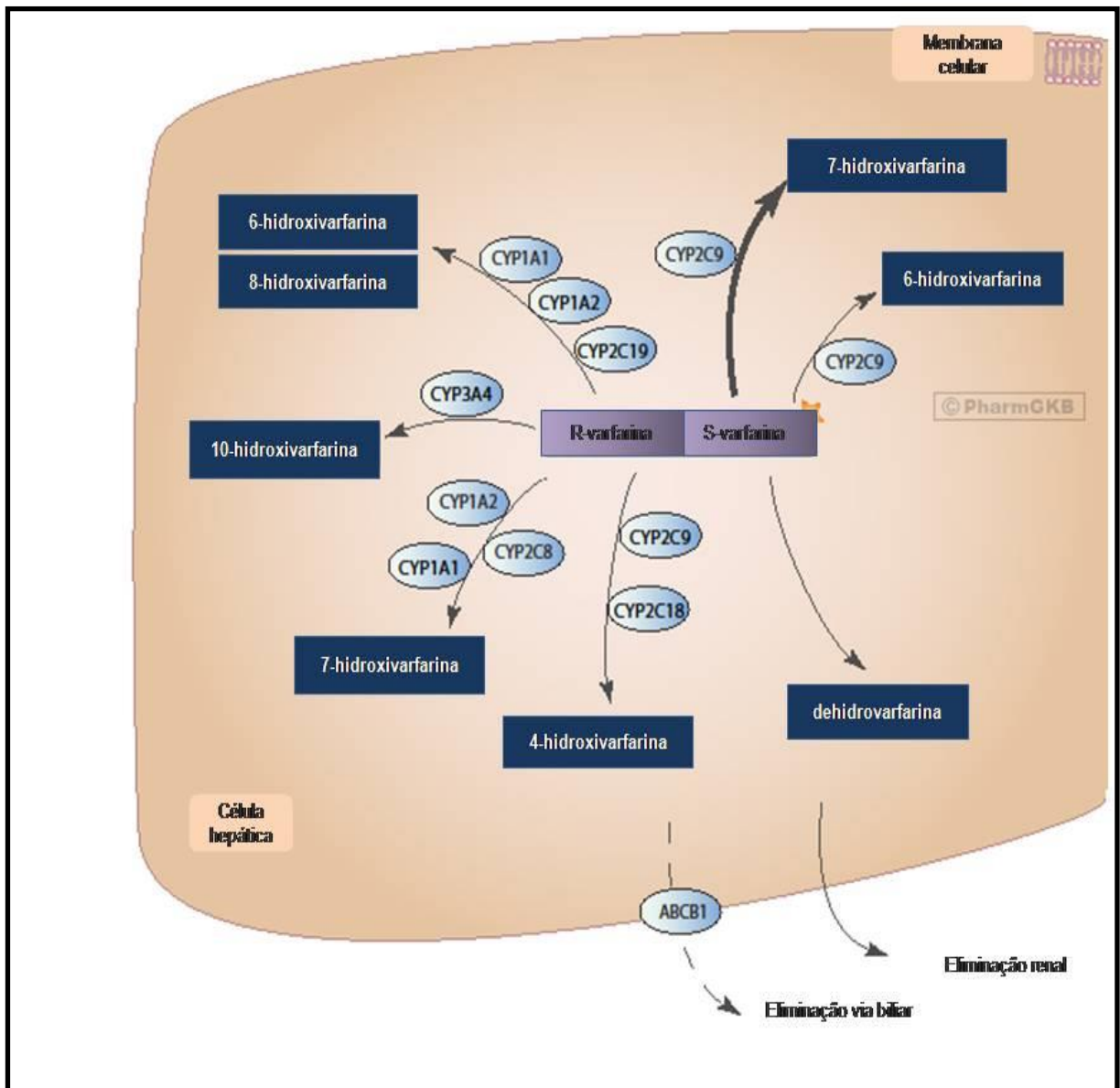


Figura 2: Representação esquemática do metabolismo da varfarina. Fonte: PharmGKB: Pathway - Warfarin Pathway, Pharmacokinetics de < <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011113?previousQuery=warfarin>>.

2.2.4 Reações adversas e toxicidade

A varfarina é o segundo fármaco mais comum, após a insulina, implicada em atendimentos de emergências devido aos efeitos adversos de fármacos (U.S.FDA, 2009; Wofford *et al.*, 2008). A metabolização inadequada da varfarina é frequente em cerca de 30% dos pacientes em terapia anticoagulante com varfarina, o que favorece a ocorrência de hemorragia ou de recorrência de tromboembolismo (U.S.FDA, 2009).

O sangramento se caracteriza por maior duração do tempo de estancamento e do fluxo de lesões epiteliais, aumento do tempo e do fluxo menstrual, hematomas e também

hemorragias de grau variado nas narinas, gengivas e intestino, dentre outros. Em casos mais graves, o paciente pode vir a apresentar anemia. Esta variação é dependente da duração e intensidade da anticoagulação, do uso concomitante de diversos medicamentos e do sítio anatômico alvo (Hirsh *et al.*, 2003).

Há vários fatores que potencializam o risco de hemorragia durante o uso de varfarina, como idade superior a 65 anos, desconhecimento da dose terapêutica adequada no início do tratamento, emprego de altas doses de varfarina, metabolismo farmacológico lento, situações de lesões vasculares e teciduais, diversas patologias (hipertensão, insuficiência renal, anemia, doenças cardíacas), interações farmacológicas e ingestão de alimentos ricos em vitamina K (Hirsh *et al.*, 2003).

2.2.5 Interações farmacológicas e não farmacológicas

Várias substâncias de uso farmacológico podem interagir com a varfarina, seja afetando a dose necessária para o objetivo terapêutico ou intensificando os efeitos colaterais (Hirsh *et al.*, 1995). As interações podem ocorrer quando há alteração nos eventos de integridade da superfície epitelial, captação e metabolismo da varfarina ou da vitamina K e, também, nos eventos de síntese, função ou depuração de fatores envolvidos na hemostasia (Brunton *et al.*, 2011).

Indução enzimática, inibição enzimática e redução da ligação às proteínas plasmáticas são os principais mecanismos farmacocinéticos de interação da varfarina com outros fármacos. Por sua vez, os mecanismos de interação farmacodinâmica da varfarina com os demais fármacos são sinergismo (hemostasia prejudicada, redução da síntese de fatores da coagulação), antagonismo competitivo pela vitamina K e alteração conformacional dos receptores envolvidos no metabolismo da vitamina K (Brunton *et al.*, 2011; Hirsh *et al.*, 1995). A lista de fármacos que afetam a ação dos anticoagulantes orais é bem extensa e cresce continuamente. O **quadro 1** apresenta uma lista resumida de classes farmacológicas de fármacos que constituem risco potencial de interação com varfarina, seja como ação antagonista ou potencializadora. A varfarina também é influenciada por fatores não farmacológicos, como bebidas alcoólicas, vegetais de folhas verdes que contém vitamina K e suplementos vitamínicos contendo vitamina K. A administração de doses elevadas de vitamina K pode neutralizar a ação dos anticoagulantes orais (Brunton *et al.*, 2011; Hirsh *et al.*, 1995). Independente do mecanismo de interferência sobre a varfarina, a adição ou retirada da prescrição de qualquer medicamento, deve ser realizada com monitoramento freqüente e criterioso do RNI, até que o mesmo se estabilize novamente (Zago *et al.*, 2001).

Quadro 1: Lista de classes farmacológicas de fármacos que constituem risco potencial de interação com varfarina, como ação antagonista ou potencializadora.

Classes de fármacos potencializadores de varfarina	Classe de fármacos antagonistas de varfarina
Inibidor da 5-lipoxigenase Estimulantes adrenérgicos centrais Analgésicos Anestésicos inalatórios Antiandrogênicos Antiarrítmicos Antibióticos (Aminoglicosídeos orais, cefalosporínicos parenterais, macrolídeos, penicilínicos intravenosos, quinolonas, sulfonamidas de ação prolongada e tetraciclina) Anticoagulantes Anticonvulsivantes Antidepressivos Antimaláricos Antineoplásicos Antiparasíticos/Antimicrobianos Antiplaquetários Bloqueadores beta-adrenérgicos Colelitólíticos Antidiabéticos orais Diuréticos Fúngicos sistêmicos Antiácidos e agentes procinéticos gastrintestinais Agentes para Colite Ulcerativa Agentes de tratamento de gota Fármacos hepatotóxicos Hiperglicêmicos Anti-hipertensivos emergenciais Hipnóticos Hipolipidêmicos Inibidores da monoamina-oxidase Narcóticos de ação prolongada Antiinflamatórios não-esteroidais Psicoestimulantes Pirazolonas Salicilatos Inibidores seletivos de recaptção de serotonina Esteróides adrenocorticais Esteróides anabólicos Trombolíticos Fármacos para tratamento da tireóide	Inibidores de esteróides adrenais Antiácidos Ansiolíticos Antiarrítmicos Antibióticos Anticonvulsivantes Antidepressivos Anti-histamínicos Antineoplásicos Antipsicóticos Barbitúricos Diuréticos Suplementos nutricionais entéricos Fúngicos sistêmicos Hipnóticos Hipolipidêmicos Imunossupressores Contraceptivos orais, contendo estrógeno Moduladores seletivos de receptor de estrógeno Esteróides adrenocorticais Antituberculosos Vitaminas

Nota: Dentro de uma mesma classe, existem fármacos que interagem de forma distinta com a varfarina. Desta forma, algumas classes de fármacos estão incluídas nas categorias de potencializador e de antagonista de varfarina. Fonte: Brunton et al., 2011; Micromedex, 2010.

2.2.6 Resistência à varfarina

A administração de doses de varfarina inferiores a necessária, também representa um problema para os pacientes em terapia anticoagulante, pois o risco de tromboembolismo permanece presente (Harrington *et al.*, 2008). Requerimento de dosagens muito altas é um evento menos frequente que a sensibilidade à varfarina, embora não menos importante. Seja de origem hereditária ou adquirida, mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são sugeridos para explicar este fato, (Sinxadi *et al.*, 2008) então, denominado de resistência à varfarina, a qual foi definida como a incapacidade deste anticoagulante levar o tempo de protrombina para níveis adequados de anticoagulação, quando administrado com uma dose próxima ou equivalente às doses normalmente recomendadas (Lefrere *et al.*, 1987). Alguns autores consideram que nos casos de resistência, o requerimento de varfarina é superior a 70mg/semana para a obtenção de RNI na faixa terapêutica (Loebstein *et al.*, 2007; Sinxadi *et al.*, 2008) ou o RNI terapêutico não é alcançado (Harrington, 2008). Watzka *et al.* (2010) discrimina a resistência à varfarina em parcial, definida como um alto requerimento de varfarina, mas com o alcance de um RNI estável; e em completa, definida como um alto requerimento de varfarina, mas sem atingir um RNI estável (Watzka *et al.*, 2010). Sinxadi e Blockman (2008) afirmam que a verdadeira resistência à varfarina é rara, cuja frequência é inferior a 0,1% e que não deve ser confundida com casos de não aderência ao tratamento anticoagulante (Sinxadi *et al.*, 2008). Vale ressaltar que são desconhecidos estudos de resistência à varfarina na população brasileira e que a frequência desta pode ser distinta da frequência descrita em outras populações.

Mutações de sentido trocado no gene *VKORC1* têm sido descritas como causas de resistência farmacodinâmica à varfarina. Por outro lado, outras causas de resistência à varfarina também devem ser consideradas, como má absorção do fármaco (Talstad *et al.*, 1994), ingestão aumentada de vitamina K (Booth *et al.*, 1998), interações medicamentosas e *clearance* metabólico de varfarina aumentado, caracterizando a resistência farmacocinética, além da possibilidade de má adesão ao tratamento (Lefrere *et al.*, 1987; Sinxadi *et al.*, 2008; Harrington *et al.*, 2008; *The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*, 2009).

2.3 FARMACOGENÉTICA DA VARFARINA

2.3.1 Farmacogenética e Farmacogenômica

Os primeiros relatos de que características genéticas poderiam afetar os efeitos dos fármacos ocorreram por volta de 1940 e 1950, dando início aos estudos de

farmacogenética. Somente em 1980, as bases moleculares da farmacogenética passaram a ser conhecidas. A partir de 1990, um grande número de polimorfismos gênicos foram identificados como interferentes nos vários processos pelos quais um fármaco é submetido após sua administração, graças aos avanços dos métodos de análises moleculares. Polimorfismos são variações nas seqüências de DNA que apresentam uma frequência superior a 1% na população em questão, sendo sua maioria definida como polimorfismos de base única (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) (Hutz *et al.*, 2004).

A farmacogenética é a ciência que prediz a resposta aos fármacos, baseando-se em marcadores genéticos individuais (U.S.FDA, 2009), ou seja, a farmacogenética está focada em efeitos de genes isolados (Metzger *et al.*, 2006). No intuito de conhecer o caráter poligênico dos eventos farmacológicos de um fármaco, a farmacogenômica analisa simultaneamente vários genes e suas respectivas interações. Ambas atuam na expectativa de otimizar o tratamento farmacológico, através da individualização terapêutica, baseando-se nas peculiaridades do perfil genético dos indivíduos medicados. Para isto, é necessário identificar genes relacionados à predisposição às doenças, à modulação das respostas farmacológicas, às interferências na farmacocinética e farmacodinâmica e ao desenvolvimento de reações adversas (Metzger *et al.*, 2006).

Os últimos anos foram marcados pelo crescente número de guias farmacoterapêuticos baseados em farmacogenética, principalmente, devido aos trabalhos do FDA e de grupos científicos internacionais, como o *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC); que estão promovendo a ampliação do emprego da terapia individualizada, que começa a atingir as diversas áreas da medicina.

2.3.2 Farmacogenética da varfarina

A dificuldade do emprego da varfarina se deve à grande variação interindividual quanto à dose inicial e de manutenção necessária para atingir o objetivo terapêutico, à limitada faixa de dose terapêutica e ao grande risco de reações adversas, principalmente de hemorragia (Wadelius *et al.*, 2007). Como o processo de definição da dose adequada de varfarina pode levar de semanas a meses, os pacientes em terapia anticoagulante podem permanecer em estado de risco aumentado de sub ou super-anticoagulação por um período muito prolongado (Johnson *et al.*, 2011). Neste âmbito, a farmacogenética associa os conhecimentos de mecanismos bioquímicos às informações genéticas disponíveis, na tentativa de identificar a influência dos fatores genéticos sobre os sítios de ação da varfarina (Chen *et al.*, 2005).

Os fatores genéticos de maior importância sobre a dose de varfarina são os polimorfismos CYP2C9*2, CYP2C9*3 e do gene VKORC1, que representam risco aumentado de hemorragia durante a terapia com varfarina e, conseqüentemente, sugere o requerimento de menores doses deste fármaco para alcançar um RNI adequado e um risco atenuado de hemorragia (Taube *et al.*, 2000; Tassies *et al.*, 2002; Zoler, 2008; Rieder *et al.*, 2005; D'Andrea *et al.*, 2005).

Diante dos importantes avanços da farmacogenética na varfarina, o U.S. Food and Drug Administration (U.S.FDA, 2009) aprovou, em agosto de 2007, o “Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information”, o qual dispõe que indivíduos com variações genéticas, especificamente nos genes CYP2C9 e VKORC1, respondem de forma farmacologicamente diferente à varfarina, influenciando na posologia desta. Em 2010, o FDA acrescentou na bula do medicamento Coumadin® recomendações de intervalos de doses iniciais para pacientes, conforme seus genótipos de CYP2C9 e VKORC1 (quadro 2).

Quadro 2: Recomendações aprovadas pelo FDA e inseridas na bula do medicamento Coumadin® sobre as doses diárias de varfarina (mg/dia) para alcançar um RNI terapêutico, baseadas nos genótipos de CYP2C9 e VKORC1.

VKORC1: -1639G>A	CYP2C9 *1/*1	CYP2C9 *1/*2	CYP2C9 *1/*3	CYP2C9 *2/*2	CYP2C9 *2/*3	CYP2C9 *3/*3
GG	5,0 - 7,0	5,0 - 7,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	0,5 - 2,0
GA	5,0 - 7,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0
AA	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0	0,5 - 2,0

Fonte: Johnson *et al.*, 2011.

Frente ao grande número de estudos mostrando a relação entre fatores genéticos e ambientais com as doses de varfarina, vários algoritmos baseados nestes dois tipos de fatores têm sido construídos nos últimos anos e predizem melhor a dose de varfarina que a tabela recomendada pelo FDA. No entanto, na impossibilidade de consultar um algoritmo, a recomendação para consulta à tabela do FDA permanece. Dois exemplos de algoritmos empregados para estimar a dose de varfarina estável estão disponíveis nos sites <http://www.warfarindosing.org> da Washington University Medical Center e <http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA162372936&objCls=Dataset#tabview=tab2>, do International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (IWPC). Ambos foram baseados em estudos com mais de 5000 indivíduos e apresentam as doses diárias em casas decimais. A partir da dose estimada pelo algoritmo, o médico define o melhor esquema terapêutico. Os

fatores considerados são idade, sexo, etnia, peso, altura, fumo, indicação de varfarina, RNI, interações com fármacos e genótipos de *CYP2C9* e *VKORC1* (Johnson *et al.*, 2011). O maior benefício das informações genéticas na dosagem de varfarina aplica-se aos indivíduos que requerem doses menores que 21mg/semana ou maiores que 49 mg/semana; o que constitui 40% de todos pacientes (*International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*, 2009).

Um algoritmo na população brasileira também foi desenvolvido com 390 brasileiros em terapia anticoagulante no Rio de Janeiro, considerando os fatores idade, peso, indicação terapêutica, interação com sinvastatina e amiodarona e genótipos de *CYP2C9* (*1, *2 e *3) e *VKORC1* (3673G>A, 5808T>G, 6853G>C e 9041G>A). Estes fatores explicaram 51% da variabilidade da dose semanal de varfarina e o fator etnia não apresentou interferência na dose de varfarina (Perini *et al.*, 2008).

Outro algoritmo brasileiro foi publicado em 2011 com 279 pacientes descendentes de europeus em Porto Alegre e explicou 63,3% da variabilidade de dose de varfarina. Este algoritmo considerou os seguintes fatores: idade; peso; uso de amiodarona, carbamazepina, β -bloqueadores, anlodipina e diuréticos; 1 e 2 variantes *CYP2C9*; 1 e 2 cópias do haplótipos formados por -1639G>A, 1173C>T e 3730G>A e genótipos de *CYP4F2* e *FII* (Fator II). Ao retirar os 1173C>T, 3730G>A, *CYP4F2* e *FII*, o valor preditivo reduz para 57,7%. Tanto *CYP2C9* quanto *VKORC1* mostraram-se fortemente associados à dose de varfarina. Indivíduos com genótipos -1639GA e -1639AA apresentaram, respectivamente, doses 30 e 45% menores de varfarina que indivíduos -1639GG; enquanto indivíduos *CYP2C9**1/*2, *2/*2, *1/*3, *2/*3 apresentaram doses de varfarina menores em 17,8%, 59,6%, 26,5% e 52,9%, respectivamente (Botton *et al.*, 2011).

No entanto, os requerimentos de varfarina dependem de um número muito maior de fatores genéticos, além dos descritos anteriormente, valendo ressaltar os genes dos fatores *IX*, *FII*, *FVII* e *FX*, *APOE*, *MDR1*, *GGCX*, *PROC*, *PROS1*, *PROZ*, *GAS6*, *CALU*, *NQO1*, *CYP2C8*, *CYP2C18*, *CYP2C19*, *NR1I2*, *ORM1* e *ORM2* (Wadelius *et al.*, 2007), conforme mostra a **figura 3**. A validação da influência de inúmeros genes sobre a dose de varfarina necessária à anticoagulação desejada necessita de estudos independentes adicionais que envolvam grande números de pacientes e em diferentes etnias.

(rs1057910) as mais comuns. O alelo referência, chamado de CYP2C9*1 é considerado o metabolizador normal (Johnson *et al.*, 2011). O alelo CYP2C9*2 consiste na transição C416T no exon 3, levando à substituição Arg144Cys. A transversão A1061C no exon 7 gera a variação Ile359Leu, o que caracteriza o alelo CYP2C9*3 (Taube *et al.*, 2000; Tassies *et al.*, 2002). Estes alelos CYP2C9*2 e *3 são considerados pobres metabolizadores (Taube *et al.*, 2000), por apresentarem, respectivamente, cerca de 60 a 70% e 10 a 20% da atividade enzimática sobre a varfarina (Johnson *et al.*, 2011).

Indivíduos que apresentam os genótipos CYP2C9*2/*2, CYP2C9*3/*3 ou CYP2C9*2/*3 apresentam um alto risco de desenvolver hemorragias quando medicados com varfarina e pacientes heterozigotos, com os genótipos CYP2C9*1/*2 ou CYP2C9*1/*3 também precisam receber uma terapia anticoagulante com cautela (Tassies *et al.*, 2002). Em 2002, o estudo de Taube *et al.* sugeriu que homozigotos CYP2C9*2/*2 necessitam de uma dose média de varfarina 40% menor que homozigotos CYP2C9*1/*1 e que homozigotos CYP2C9*3 recebam a terapia anticoagulante com outros fármacos. Além disto, o risco pode aumentar se houver metabolismo competitivo no complexo CYP2C9 (Taube *et al.*, 2000).

Trabalhos mostram que a presença de um ou dois alelos de CYP2C9*2 ou CYP2C9*3 incorre no maior risco de hemorragia durante a terapia, no requerimento de menor dose de varfarina para anticoagulação adequada (Zoler, 2008; Johnson *et al.*, 2011) e também maior tempo para alcançar um RNI estável (Johnson *et al.*, 2011). Os polimorfismos de CYP2C9 estão relacionados à variação de cerca de 18% da dose de varfarina em caucasianos (Wadelius *et al.*, 2009; Limdi *et al.*, 2010; Botton *et al.*, 2011)

Na população brasileira, um estudo envolvendo 331 indivíduos saudáveis mostrou que as frequências dos polimorfismos CYP2C9*1, *2 e *3 são, respectivamente, de 0,849; 0,086 e 0,065; sendo que a população caucasiana tem de 2 a 3 vezes mais alelos variantes que a população negra (Vianna *et al.*, 2004). Isto pode ser observado nos dados de Limdi *et al.* (2010), onde os alelos *1, *2 e *3 apresentaram, respectivamente, frequências de 0,80; 0,13 e 0,07 em caucasianos e de 0,95; 0,03 e 0,02 em africano-americanos (Limdi *et al.*, 2010). Botton *et al.* (2011) encontrou frequências de 0,812; 0,134 e 0,054; respectivamente para os alelos CYP2C9*1, *2 e *3 em brasileiros de Porto Alegre, descendentes de europeus (Botton *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Gene VKORC1

Identificada na década de 70, a enzima vitamina K epóxido-redutase de 163 aminoácidos, é codificada pelo gene vitamina K epóxido-redutase complexo 1 (VKORC1),

formado por 3 exóons e mapeado em 16p12-q21 (Rost *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). A proteína VKORC1 é responsável pela reciclagem da vitamina K reduzida, que é fundamental para a gama-carboxilação dos fatores da coagulação dependentes da vitamina K (Rieder *et al.*, 2005). Este gene apresenta alguns SNPs que estão relacionados a menores doses de varfarina e mutações relacionadas à resistência hereditária à varfarina (Wadelius *et al.*, 2005).

a) Polimorfismos relacionados às variações das doses de varfarina

Os SNPs localizados nas posições nucleotídicas -1639, 1173, 22285, 3730 e 7040 estão em forte desequilíbrio de ligação, dando origem a 3 haplótipos considerados ótimos preditores da dose de manutenção da varfarina. Estes podem explicar 29 a 30% da variabilidade interindividual da resposta a varfarina. Por não corresponderem à região codificante, acredita-se que estes SNPs influenciem na transcrição, *splicing* ou estabilidade do mRNA (Wadelius *et al.*, 2005). No entanto, os haplótipos não são mais informativos que a genotipagem de um único SNP dentre os relatados e os SNPs -1639, 1173 e 22285 apresentam maior valor preditivo que os demais (Rieder *et al.*, 2005; Wadelius *et al.*, 2009). Individualmente, os SNPs -1639G>A e 1173C>T explicam igualmente a variabilidade de dose de varfarina semanal entre os três grupos brancos, negros e asiáticos e, portanto, a incorporação de outros SNPs não traz melhorias para a predição de dose. Ressalta-se que estes SNPs explicam melhor a variabilidade em brancos que em negros e asiáticos, uma vez que o poder de predição está diretamente ligado à frequência da variante alélica em cada grupo étnico (Limdi *et al.*, 2010).

O polimorfismo -1639G>A (rs9923231), localizado na região promotora do gene *VKORC1*, tem sido associado a menores doses de varfarina por inúmeros estudos (Wadelius *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007; Rieder *et al.*, 2005; *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*, 2009; Daly, 2009; Botton *et al.*, 2011), estando relacionado a variação de cerca de 30% da dose de varfarina (Wadelius *et al.*, 2009; Limdi *et al.*, 2010; Botton *et al.*, 2011). Estudos indicam que a variante -1639A altera o sítio de ligação do fator de transcrição do *VKORC1* (Rieder *et al.*, 2005), estando, portanto, associada a menor transcrição de *VKORC1* do que a variante -1639G e consequentemente a sua menor expressão gênica (Zhu *et al.*, 2007; Daly, 2009; Wadelius *et al.*, 2009).

As frequências alélicas de -1639G>A variam muito entre os diferentes grupos étnicos. Em um estudo com 4886 indivíduos de 11 países participantes do *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium* (IMPC), os alelos G e A apresentaram, respectivamente, frequências de 0,09, e 0,91 em asiáticos; de 0,90 e 0,10 em negros e 0,62

e 0,38 em brancos (Limdi *et al.*, 2010). No Brasil, as frequências de -G1639 e -A1639 foram, respectivamente, de 0,63 e 0,37 em caucasianos de Porto Alegre (Botton *et al.*, 2010) e de 0,62 e 0,38 em brancos e 0,78 e 0,22 em negros, em um grupo de pacientes em terapia anticoagulante no Rio de Janeiro (Perini *et al.*, 2008).

b) Mutações de resistência à varfarina

Após a identificação do gene *VKORC1* em 2004 (Li, 2004) e de suas funções por vários grupos de pesquisadores (Rost *et al.*, 2004; D'Andrea *et al.*, 2005; Rieder *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Wadelius *et al.*, 2005), surgiram os primeiros relatos de resistência à varfarina associada às mutações de sentido trocado em *VKORC1*. As mutações A26P, V29L, D36Y, V45A, V54L, R58G, V66M, R98W, L128R são mais frequentemente encontradas com forte associação a necessidade de altas doses de varfarina (> 70 mg/week), conferindo a resistência farmacodinâmica a este fármaco (Li *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2005; Loebstein *et al.*, 2007; Harrington *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2008; Sinxadi *et al.*, 2008).

É sugerido que a resistência à varfarina por mutações em *VKORC1* tenha padrão de herança autossômico dominante (Rost *et al.*, 2004), visto que todos os casos publicados até o momento são heterozigotos para as diversas mutações detectadas em *VKORC1*, e que somente a mutação D36Y foi encontrada em homozigose em seis pacientes com resistência à varfarina (Harrington *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2008, Watzka *et al.*, 2010). Atualmente, são conhecidas pouco mais de 20 mutações em *VKORC1* (**quadro 03**) e suas posições mutacionais são completamente ou altamente conservadas. Por análise de bioinformática, a topologia prevista para a *VKORC1* é de uma proteína de membrana politópica com quatro α -hélice atravessando a membrana do retículo endoplasmático (RE), estruturas N-terminais e C-terminais no citoplasma, e um grande *loop* localizado no lúmen do RE, com cerca de 50 resíduos de aminoácidos; conforme mostra a **figura 04**. Todas as mutações conhecidas em *VKORC1* relacionadas à resistência à varfarina estão situadas no lado luminal da membrana do retículo endoplasmático (Watzka *et al.*, 2010).

Dados de frequências de mutações em *VKORC1* ainda são escassos. Entre as mutações conhecidas, a D36Y é mais freqüente, representando 80% dos casos publicados de mutações em *VKORC1* e 25% dos casos do estudo de Watzka *et al.* (2010), e frequências de 0,043 em judeus Ashkenazi e 0,006 em judeus Sephardi (Scott *et al.*, 2008). No trabalho de Harrington *et al.* (2008), de 15 pacientes que requeriam doses de varfarina superiores a 20mg/dia e que tinham nível sérico de varfarina elevado (indicando resistência farmacodinâmica), 53% (8) apresentaram mutações em *VKORC1*, sendo V66M (4), L128R

(2), V54L (1) em heterozigose e D36Y (1) em homozigose. Estes pacientes mostraram um aumento de concentração plasmática de varfarina em relação a indivíduos sem resistência e/ou sem mutações. Estes pacientes receberam doses variando de 24 a 42mg de varfarina/dia e alcançaram um RNI estável, exceto um que foi tratado com 15 a 20 mg/dia de acenocoumarol e outro que mesmo com 40mg diários, não atingiu um RNI adequado e o tratamento com cumarínicos foi ineficiente e, portanto, abandonado (Harrington *et al.*, 2008).

Quadro 03: Lista de mutações descritas em VKORC1

Mutação	Localização nucleotídica	Referência
Ala 26Thr (A26P)	c.76G>A	Watzka <i>et al.</i> , 2010
His28Gln (H28Q)	c.84C>T	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Val29Leu (V29L)	c.85G>T	Rost <i>et al.</i> , 2004
Asp36Tyr (D36Y)	c.106G>T	Harrington <i>et al.</i> , 2008; Watzka <i>et al.</i> , 2010
Asp36Gly (D36G)	c.107A>G	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Ala41Ser (A41S)	c.121G>T	Rieder <i>et al.</i> , 2005
Val45Ala (V45A)	c.134T>C	Rost <i>et al.</i> , 2004
Ser52Trp (S52W)	c.155C>G	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Val54Leu (V54L)	c.160G>C	Harrington <i>et al.</i> , 2008
Ser56Phe (S56F)	c.167C>T	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Arg58Gly (R58G)	c.172A>G	Rost <i>et al.</i> , 2004
Trp59Leu (W59L)	c.176C>T	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Trp59Cys (W59C)	c.177G>T	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Trp59Arg (W59R)	g.6621T>C	Wilms <i>et al.</i> , 2008
Val66Met (V66M)	c.196G>A	Harrington <i>et al.</i> , 2008; Watzka <i>et al.</i> , 2010
Val66Gly (V66G)	c.197T>G	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Gly71Ala (G71A)	c.212G>C	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Asn77Ser (N77S)	c.230A>G	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Asn77Tyr (N77Y)	c.229A>T	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Arg98Trp (R98W)	c.292C>T	Rost <i>et al.</i> , 2004
Ile123Asn (I123N)	c.368T>A	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Leu128Arg (L128R)	c.383T>G	Rost <i>et al.</i> , 2004; Harrington <i>et al.</i> , 2008
Tyr139His (Y139H)	c.415T>C	Watzka <i>et al.</i> , 2010
Arg151 XX (R151Q)	c.452G>A	Harrington <i>et al.</i> , 2008

segmentos α -hélice transmembrana. Os círculos pretos mostram os cinco resíduos completamente conservados que são presumidos como cataliticamente ativos. A região em amarelo indica a região de interface entre a quarta hélice TM (transmembrana) e o lúmen do retículo endoplasmático. A região em vermelho é presumida como o sítio de ligação à 4-hidroxycumarina. Os círculos em azul indicam as posições dos 17 sítios de mutação encontrados em pacientes com resistência aos anticoagulantes orais. Fonte: Watzka *et al.*, 2010.

2.3.3.3 Gene MDR1

O gene *Multidrug-resistant transporter-1 (MDR1)*, também denominado *ABCB1 (ATP-binding cassette, subfamily b, member 1)*, localizado no cromossomo 7, codifica uma grande proteína transmembrana (TM), a Glicoproteína-P (PGP) ou MDR1 (Sakaeda *et al.*, 2005), que pertence a superfamília *ATP-binding cassette (ABC)* (Sakaeda *et al.*, 2002). A proteína MDR1 é um transportador de efluxo unidirecional, energia-dependente, que exporta seus substratos do interior para o exterior das células, protegendo-as de inúmeras substâncias e metabólitos tóxicos (Sakaeda *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas, a proteína MDR1 está expressa em vários tecidos humanos, incluindo rins, fígado, intestino delgado e grosso, barreira hemato-encefálica, cérebro, testículos, músculos, placenta e adrenais (Leschziner *et al.*, 2007; Sakaeda *et al.*, 2002). O nível de expressão e funcionalidade de MDR1, em cada um destes tecidos, afeta diretamente a farmacocinética e a efetividade terapêutica dos inúmeros fármacos que são substratos deste transportador (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Sakaeda *et al.*, 2002). Consequentemente, a MDR1 é considerada a principal proteína responsável por limitar a absorção de fármacos administrados oralmente e a excreção de metabólitos pelas vias renal e hepática (Sakaeda *et al.*, 2005; Leschziner *et al.*, 2007; Aszalos *et al.*, 2007). Além disto, a resistência intrínseca a vários fármacos é atribuída à proteína MDR1, uma vez que ela pode exportar desnecessariamente substâncias e metabólitos (Sakaeda *et al.*, 2005).

São conhecidos mais de 100 polimorfismos no gene *MDR1* (Maeda *et al.*, 2008). O polimorfismo 3435C>T, uma alteração sinônima localizada no exon 26, tem sido associado a alterações farmacocinéticas de muitos fármacos. Em 2002, um estudo de predição de metabolismo de diversos fármacos empregando linhagens de células hepáticas humanas, apontou o anticoagulante varfarina como um substrato da proteína MDR1 (Sussman *et al.*, 2002). No entanto, até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos no sentido de elucidar a associação entre MDR1 e as doses requeridas de varfarina. O estudo de Wadelius *et al.*, (2004) relatou menor requerimento de varfarina em um grupo de 20 indivíduos contendo um haplótipo de *MDR1*, formado pela variante 3435T e pelas formas selvagens dos SNPs -12T>C, -1G>4, 1199G>A, 1236C>T, 2677G>T/A e 3396C>T (Wadelius *et al.*, 2004). No entanto, Saraeva *et al.*, (2007) investigaram a associação entre

as doses requeridas de acenocoumarol e os polimorfismos 61A>G, 2677G>T e 3435C>T do gene *MDR1*, em 96 pacientes búlgaros. O acenocoumarol é um anticoagulante, antagonista de vitamina K, de estrutura análoga à varfarina e mais amplamente usado na Europa. Neste estudo, o haplótipo *MDR1* 2677GG/3435CC foi associado com o uso de menores doses de acenocoumarol, enquanto o haplótipo *MDR1* 2677GT/3435TT foi associado a doses maiores de acenocoumarol (Saraeva *et al.*, 2007).

2.3.3.4 Gene APOE

O gene *APOE*, codificador da apolipoproteína E (ApoE), localizado no cromossomo 19, apresenta 3 alelos codominantes $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$, cujas isoformas proteicas se distinguem pela posição e carga dos aminoácidos cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do exón 4 (Richard *et al.*, 1994). Em suma, os alelos de *APOE* são determinados segundo o padrão dos 2 polimorfismos 388T>C (Cys112) e 526C>T (Arg 158), sendo cada alelo determinado da seguinte forma:

ApoE $\epsilon 3$ - 388T (selvagem) e 526C (selvagem);

ApoE $\epsilon 2$ - 388T (selvagem) e 526T (mutante);

ApoE $\epsilon 4$ - 388C (mutante) e 526C (selvagem); (Richard *et al.*, 1994).

A combinação destes 3 alelos origina os fenótipos $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 2$ e $\epsilon 4/\epsilon 2$, cuja frequência varia em diferentes populações. Na população caucasiana em geral, a frequência do genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ varia de 65 a 85%, enquanto os genótipos $\epsilon 3/\epsilon 2$ e $\epsilon 4/\epsilon 3$ correspondem, respectivamente por 8% e 15% da frequência. Os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 2$ são raros (Wadelius *et al.*, 2007). No entanto, em indivíduos portadores de doença de Alzheimer, a frequência do alelo $\epsilon 4$ é geralmente muito elevada, com valores entre 25% e 40%. A importância do alelo $\epsilon 4$ é discrepante entre os diversos grupos étnicos (Caramelli *et al.*, 1999).

Estes polimorfismos no gene *APOE* podem também parcialmente explicar a variabilidade interindividual de dose da varfarina, por alterarem o transporte da vitamina K do intestino delgado para o fígado, conforme mostra figura 3 (Kohnke *et al.*, 2005a; Wadelius *et al.*, 2007; Kimmel *et al.*, 2008). O estudo de Kimmel *et al.* (2008) observou que a dose de manutenção semanal de varfarina foi significativamente maior em afro-americanos do que em caucasianos ($p = 0,018$) e, simultaneamente, que o alelo $\epsilon 4$ foi mais frequente no grupo de afro-americanos (37,8%) que em caucasianos (26,4%). Em adição, entre os afro-americanos, a dose média de manutenção de varfarina aumentou de acordo com os

genótipos associados a diferentes depurações hepáticas, sendo $\epsilon 2/\epsilon 2$ ou $\epsilon 2/\epsilon 3$: 30,0mg; $\epsilon 3/\epsilon 3$: 35,0mg; $\epsilon 4/\epsilon 4$ ou $\epsilon 3/\epsilon 4$: 45,0mg (Kimmel *et al.*, 2008).

Por sua vez, Kohnke *et al.* (2005a) afirmou que pacientes suecos homocigotos $\epsilon 4/\epsilon 4$ tendem a receber maiores doses de varfarina que os outros genótipos de *APOE*. Entre indivíduos CYP2C9 pobres metabolizadores (*2 e *3), os pacientes homocigotos $\epsilon 4/\epsilon 4$ significativamente receberam maiores doses de varfarina que aqueles pacientes que portavam um ou nenhum alelo $\epsilon 4$ e, portanto, neste grupo de pacientes, os genótipos *APOE* explicaram 6% da variação de dose de varfarina (Kohnke *et al.* 2005a). Em adição, segundo o estudo de Wadelius *et al.* (2007) com 201 suecos, os portadores de alelos $\epsilon 4$ e $\epsilon 2$ requerem maiores doses de varfarina que aqueles com $\epsilon 3$ (Wadelius *et al.*, 2007). Em contrapartida, o estudo de Cavallari *et al.* (2011) com 92 africano-americanos observou que pacientes com genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ levaram maior tempo para estabilização da dose de varfarina em comparação aos indivíduos com alelos $\epsilon 2$ ou $\epsilon 4$ (Cavallari *et al.*, 2011).

Como portadores do alelo $\epsilon 4$ têm menores níveis de vitamina K circulante que outros, a explicação da relação entre maiores doses de varfarina e alelo $\epsilon 4$, proposta por Kohnke *et al.* (2005a), seria que os portadores do alelo $\epsilon 4$ têm uma maior captação de vitamina K pelo fígado e que, portanto, requerem maiores doses de varfarina para compensar esta captação. Mas é uma hipótese não comprovada.

2.3.3.5 Gene UGT1A1

Recentemente, Bratton *et al* (2012) demonstrou que os enantiômeros originados do metabolismo da varfarina, as hidroxivarfarinas, são glicuronidados por enzimas uridina-difosfato-glicuronosiltransferases (UGTs) e que a isoforma UGT1A1 (*UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1*) tem capacidade para glicoronidação das hidroxivarfarinas superior as outras demais isoformas (Bratton *et al.*, 2012). A glicoronidação aumenta significativamente a solubilidade em água, gerando metabólitos prontos para eliminação (Jones *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2010).

O gene *UGT1A1* (*UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A1*), localizado no cromossomo 2, apresenta uma série de polimorfismos, destacando neste contexto, o polimorfismo UGT1A1(TA)₇, também chamado UGT1A1*28. Este polimorfismo é uma sequência de sete repetições de timina-adenina (TA), enquanto que o alelo de tipo selvagem compreende seis repetições e é denotado como UGT1A1(TA)_{6/6} ou UGT1A1*. O comprimento da sequência de repetição TA está inversamente relacionada com a atividade desta enzima; portanto, o polimorfismo UGT1A1(TA)₇ resulta em menor atividade enzimática, o que afeta a eliminação de seus diversos substratos de fármacos (Marques *et al.*, 2010).

Desta forma, o polimorfismo UGT1A1(TA)₇ pode ser um dos fatores genéticos determinantes de requerimento de altas doses de varfarina. Indivíduos homozigotos UGT1A1(TA)_{7/7} apresentam significativamente menor atividade de glicoronidação de R-7-hidroxicoumatina. Estima-se que a atividade de glicoronidação da enzima UGT1A1 para seus diversos substratos esteja reduzida a 25% e 70%, respectivamente, em indivíduos homozigotos e heterozigotos para o alelo (TA)₇ (Bratton *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar fatores clínicos e fatores genéticos que possam influenciar na dose de manutenção individualizada de varfarina em indivíduos sob tratamento anticoagulante após evento de tromboembolismo.

3.2 Objetivos específicos

- I. Selecionar o grupo de pacientes diagnosticados com trombose e em terapia anticoagulante com varfarina.
- II. Caracterizar os pacientes quanto ao gênero, idade, peso corporal, altura, IMC, dose de varfarina, valor de RNI, frequência de monitorização do RNI, uso de outros medicamentos, co-morbidades, indicação da anticoagulação, entre outros.
- III. Realizar a genotipagem dos polimorfismos *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3*, *-1639G>A* de *VKORC1*, *3435C>T* de *MDR1*, *APOE *ε4* e *UGT1A1(TA)₇* nos pacientes em terapia anticoagulante envolvidos no estudo e determinação das respectivas frequências genotípicas e alélicas.
- IV. Identificar os indivíduos com resistência à terapia anticoagulante com varfarina, segundo seu conceito na literatura científica.
- V. Determinar se há associação entre as variáveis estudadas e a dose de varfarina administrada.
- VI. Avaliar fatores genéticos que possam influenciar na dose de manutenção individualizada de varfarina em indivíduos sob tratamento anticoagulante após evento de tromboembolismo.

4 CAPITULOS

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos, que correspondem aos dois artigos publicados por este grupo.

4.1 Capítulo 1

O Capítulo 1 refere-se ao artigo publicado no *Journal of Thrombosis and Haemostasis*:

Almeida VCO, Ferreira ACS, Ribeiro DD, Borges KBG, Fernandes APSM, Godard ALB. **Association of the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and therapeutic doses of warfarin in thrombophilic patients.** J Thromb Haemost. 2011; 9(10):2120-2.

4.2 Capítulo 2

O Capítulo 2 refere-se ao artigo publicado no *Molecular Diagnosis & Therapy*:

Almeida VCO, Ferreira ACS, Ribeiro DD, Borges KBG, Godard ALB. **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. DOI: 10.1007/s40291-014-0121-4.

5 DISCUSSÃO

Os dois artigos apresentados foram realizados a partir da mesma população de indivíduos com tromboembolismo sob terapia anticoagulante no Ambulatório de Hematologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A diferença de população entre eles baseia-se em 6 indivíduos que foram acrescentados ao grupo para o estudo apresentado no capítulo 2.

No capítulo 1, o grupo de 110 indivíduos apresentou idade média de $42,3 \pm 14,5$ anos e foi composto por 65,5% de mulheres e 34,5% de homens. Neste trabalho, o objetivo principal foi investigar a associação entre o polimorfismo *MDR1* 3435C>T e as doses requeridas de varfarina. Concluiu-se que o genótipo 3435TT contribuiu para requerimentos de maiores doses de varfarina, baseando nos resultados abaixo destacados:

- ✓ Segundo o modelo de herança recessivo, a variante alélica 3435T foi mais frequente no grupo que apresentou dose ≥ 70 mg/varfarina/semana do que no grupo com doses menores que 70mg/varfarina/semana ($p = 0,007$).
- ✓ Os 22 pacientes do grupo que recebeu dose ≥ 70 mg/varfarina/semana apresentaram chance dezenove vezes maior de apresentar o genótipo 3435TT (73%: 16 indivíduos) do que os dois outros genótipos (23%).
- ✓ As doses médias de varfarina para os indivíduos com genótipos 3435TT, 3435CT e 3435CC foram, respectivamente, de $60,1 \pm 45,8$; $45,0 \pm 29,1$ e $36,9 \pm 21,8$ mg/semana.
- ✓ O genótipo 3435TT e o uso de carbamazepina e/ou azatioprina associam-se independentemente à dose de varfarina.

A associação relatada entre o genótipo 3435TT de *MDR1* e as doses de varfarina pode ser explicada pela diminuição da absorção intestinal de varfarina ou pela excreção hepática aumentada desta nos indivíduos com genótipo 3435TT. Vale a pena ressaltar que casos de resistência à varfarina devido a falhas de absorção têm sido relatados na literatura e, embora a localização precisa da absorção de varfarina seja desconhecida, o duodeno proximal é o local mais provável que ocorra (Sabol *et al.*, 2009).

Diante destes resultados e do conhecimento que a variação interindividual da dose de varfarina, necessária para atingir o objetivo terapêutico, é dependente de inúmeros fatores não-genéticos e genéticos, realizou-se o estudo do Capítulo 2; que teve como objetivo principal investigar o impacto de fatores clínicos e dos polimorfismos *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *VKORC1* -1639G>A, *MDR1* 3435C>T, *APOE* * ϵ 4 e *UGT1A1*(TA)_n sobre as

doses requeridas de varfarina. Por sua vez, este trabalho foi desenvolvido na mesma população do estudo do Capítulo 1 acrescida de 6 indivíduos que foram incluídos do estudo. A inclusão destes 6 indivíduos não alterou os dados de idade média e representatividade entre os gêneros; mantendo os índices de idade média de $42,3 \pm 14,5$ anos e composição por 65,5% de mulheres e 34,5% de homens.

O estudo do capítulo 2 evidenciou a ampla variabilidade interindividual de dose de varfarina em indivíduos sob terapia anticoagulante para prevenção de tromboembolismo na população brasileira, destacando os seguintes resultados:

- ✓ A variabilidade de dose decorreu da influência da idade, IMC, gênero, uso de antagonistas de varfarina e dos polimorfismos genéticos *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *VKORC1 -1639G>A*, *MDR1 3435C>T*, *APOE *ε4* e *UGT1A1(TA)₇*.
- ✓ Os alelos *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3* foram mais frequentes entre os indivíduos que receberam doses ≤ 21 mg/varfarina/semana ($p < 0,001$) quando comparado aos demais grupos.
- ✓ A dose média de varfarina variou significativamente ($p = 0,007$) entre os genótipos de *-1639G>A VKORC1*: *-1639GG* ($57,8 \pm 38,3$ mg), *-1639GA* ($42,3 \pm 25,2$ mg) e *-1639AA* ($17,4 \pm 4,7$ mg), sendo a dose deste último grupo 70% menor ($p = 0,045$) que o primeiro.
- ✓ A presença do alelo *APOE *ε4* foi associada à dose de varfarina, sendo esta 21% menor em portadores deste alelo em relação aos portadores somente dos alelos $\epsilon 2$ e/ou $\epsilon 3$.
- ✓ Como no Capítulo 1, o genótipo *3435TT* ($p = 0,038$) está associado a maiores doses de varfarina. Devido ao aumento do tamanho amostral no Capítulo 2, os resultados estatísticos não foram completamente iguais, mas todos equiparáveis e direcionando para as mesmas conclusões sobre a influência do polimorfismo *MDR1 3435C>T* sobre a dose de varfarina.
- ✓ O polimorfismo *UGT1A1(TA)_n* também mostrou associação ($p = 0,029$) com a dose de varfarina, estando o alelo *7/7* mais frequente no grupo com dose ≥ 70 mg/varfarina/semana.
- ✓ O grande percentual de indivíduos com requerimento de altas doses de varfarina foi atribuída ao IMC > 25 , ao uso de antagonistas de varfarina e a presença dos alelos *MDR1 3435T* e *UGT1A1(TA)₇*.

A amplitude de variação da dosagem de varfarina (8.1 a 245.0mg) e os 20.7% de indivíduos que apresentaram dose ≥ 70 mg reforçaram o desafio da monitorização da terapia anticoagulante. Observou-se também nesta população uma dose média elevada de

varfarina (49.5 ± 33.6 mg) em comparação aos trabalhos na população brasileira de Botton *et al.* (2010) (33.5 ± 14.1 mg) e Perini *et al.* (2008) (28.9 ± 12.3 mg em brancos). As características quanto à idade, sexo, variabilidade de dose e uso de antagonistas das populações dos dois outros trabalhos brasileiros são distintas da população deste estudo (Perini *et al.*, 2008; Botton *et al.*, 2011) e, portanto, inviabilizam comparações quanto a altos requerimentos de varfarina e à resistência à varfarina. Além disto, estes dois trabalhos não usaram ponto de corte de dose de varfarina e todos os indivíduos incluídos no estudo estavam com dose estável de varfarina.

Vale a pena destacar a análise realizada sobre o polimorfismo UGT1A1(TA)₇. Este é o primeiro estudo que avalia um gene envolvido no metabolismo de fase II sobre a dose de varfarina. Estudos recentes têm mostrado a associação da glicuronidação sobre a inativação e *clearance* da varfarina, o que pode representar um importante passo no entendimento do metabolismo da varfarina e na definição de estratégias terapêuticas para uma anticoagulação individualizada e assertiva. Os resultados indicam que o polimorfismo UGT1A1(TA)₇ pode ser um dos fatores genéticos determinantes de requerimento de altas doses de varfarina. Estima-se que a atividade de glicuronidação da enzima UGT1A1 para seus diversos substratos esteja reduzida a 25% e 70%, respectivamente, em indivíduos homocigotos e heterocigotos para o alelo (TA)₇ (Bratton *et al.*, 2012). É importante considerar que existem vários fármacos indutores e inibidores da atividade de UGT1A1 e que 69% da população deste estudo usava um ou mais medicamentos concomitantes à varfarina. Indivíduos tratados concomitantemente com um fármaco substrato de UGT1A1 e um indutor podem requerer maiores doses do fármaco substrato para alcançar um tratamento eficaz. Em contrapartida, o uso concomitante de inibidores e fármacos substratos de UGT1A1 pode resultar em maior inibição da atividade da enzima e, conseqüentemente, acúmulo do fármaco no organismo e toxicidade (Marques *et al.*, 2010). A frequência alélica de 0.31 para (TA)₇ foi semelhante à relatada para as populações caucasianas européias e brasileira e inferior às africanas, que varia de 0.32 a 0.60 (Fertrin *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2010).

É importante ainda ressaltar que os efeitos indutor e inibidor de outros fármacos também devem ser considerados para a proteína MDR1. No entanto, não são conhecidos relatos na literatura de como esta alteração pode ocorrer, sendo necessários estudos funcionais para melhor compreensão.

A frequência dos polimorfismos estudados neste trabalho varia entre os diferentes grupos étnicos, tornando o impacto das variantes estudadas extremamente dependente da estrutura genética de cada população (Marques *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). Este trabalho é de grande importância para a população brasileira, uma vez que seu alto grau de miscigenação e seus fatores ambientais específicos implicam em características muito

particulares da terapia anticoagulante em seus indivíduos, dificultando que dados epidemiológicos de outras populações sejam estendidos a ela. Além disso, o conhecimento do perfil genético dos indivíduos com requerimentos de doses altas de varfarina possibilita um direcionamento terapêutico mais eficaz e seguro da anticoagulação, principalmente, ao auxiliar na prevenção de recorrência de TE. Por fim, os resultados inéditos sobre o UGT1A1 representam um importante passo na investigação das vias metabólicas que levam à desintoxicação e excreção da varfarina e dos mecanismos de interações medicamentosas.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o IMC, o uso de antagonistas de varfarina e os genótipos *MDR1* 3435TT e *UGT1A1*(TA)_{7/7} estão relacionados à necessidade de maiores doses de varfarina para se alcançar a anticoagulação terapêutica adequada; podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência à varfarina. Em contrapartida, o aumento de idade, a presença das variantes *2 e *3 de *CYP2C9*, -1639A de *VKORC1* e o alelo ε4 de *APOE* demonstraram contribuir para menores requerimentos de doses de varfarina.

Estes resultados evidenciaram que fatores genéticos podem influenciar a variabilidade de dose de varfarina na população estudada e que devem ser investigados a fim de melhor adequar o tratamento anticoagulante em indivíduos com tromboembolismo.

A alta frequência encontrada de resistência a varfarina foi um dado surpreendente e mostra a relevância e necessidade de se conhecer os fatores envolvidos na sua ocorrência. Este conhecimento é fundamental para o acompanhamento terapêutico adequado de indivíduos com trombose e em terapia anticoagulante com varfarina, visando alcançar uma anticoagulação estável e individualizada e, assim, evitando os riscos de reações adversas à varfarina em pacientes com trombose.

7 PERSPECTIVAS

Diante do grande número de pacientes com necessidade de altas doses de varfarina nesta população, das consequências de uma anticoagulação ineficiente, da diversidade genética da população brasileira e da escassez de estudos nesta população; a continuidade deste trabalho poderá ser de grande valia para o conhecimento mais aprofundado das causas de resistência à varfarina e, também, para determinação de melhores ferramentas de auxílio à terapia anticoagulante. Neste sentido, sugere-se continuar a investigação das causas de maiores requerimentos de varfarina em indivíduos com tromboembolismo com o sequenciamento das regiões exônicas e intron-exons do gene *VKORC1*. Espera-se detectar variantes genéticas já descritas na literatura ou novas mutações relacionadas à resistência a varfarina, específicas desta população. Também sugere-se realizar caracterização clínica dos pacientes de forma muito refinada, visando analisar associações dos fatores analisados neste estudo com dados de recorrência de TEV, co-morbidades, duração de anticoagulação, variações de RNI, reações adversas, dentre outras.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aszalos A. Drug–drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1): I.Preclinical aspects. *Drug Discovery Today*. 2007; 12(19/20):833-837.

Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr*. 1998; 128(5):785-8.

Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 72(3):442-50.

Bratton SM, Mosher CM, Khallouki F, Finel M, Court MH, Moran JH, et al. Analysis of R- and S-hydroxywarfarin glucuronidation catalyzed by human liver microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 340(1):46-55.

Cabral NL, Volpato D, Ogata RS, Ramirez T, Moro C, Gouveia S. Fibrilação atrial crônica, AVC e anticoagulação: Sub-uso de warfarina? *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(4):1016-21.

Caramelli P, Nitrini R, Maranhão R, Lourenço AC, Damasceno MC, Vinagre C, et al. Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 1999; 100(1):61-3.

Cavallari LH, Butler C, Langae TY, Wardak N, Patel SR, Viana MA, et al. Association of apolipoprotein e genotype with duration of time to achieve a stable warfarin dose in african-american patients. *Pharmacotherapy*. 2011; 31(8):785-92.

Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, Bentley D, Deloukas P, Wadelius M. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing. *Blood*. 2005; 106(10):3673-4.

Daly, AK. Pharmacogenomics of anticoagulants: steps toward personal dosage. *Genome Medicine*. 2009; 1:10.

D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Perna PD, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005; 105(2):645-9.

Fertrin KY, Gonçalves MS, Saad ST, et al. Frequencies of UDP- glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Genet* 2002; 108: 117-9.

Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet.* 2001; 109(4):369-84.

Brunton LL, Blumenthal DK, Murri N, et al. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 2011.

Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford, AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost.* 2005; 93:23–6.

Harrington DJ, Gorska R, Wheeler R, Davidson S, Murden S, Morse C, et al. Pharmacodynamic resistance to warfarin is associated with nucleotide substitutions in VKORC1. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(10):1663-70.

Hirsh J, Dalen JE, Deykin D, Poller L, Bussey H. Oral anticoagulants – mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest.* 1995; 108(4):231S-46S.

Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/ American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation.* 2003; 107:1692-711.

Hoffmeyer S, Burk O, Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS.* 2000; 97(7): 3473–8.

Hutz MH, Fiegenbaum M. Farmacogenômica. In: Mir L (Ed). 1ª edição. Genômica. 1ª edição. São Paulo: Editopa Atheneu; 2004. p.663-78.

Jacobson BF, Schapkaitz E, Haas S, Dalby T, Mer M, Patel M, et al. Maintenance of Warfarin Therapy at an Anticoagulation Clinic. *SAMJ.* 2007; 97(12):1259-65.

Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90(4):625-9.

Jones DR, Moran JH, Miller GP. Warfarin and UDP-glucuronosyltransferases: writing a new chapter of metabolism. *Drug Metab Rev.* 2010; 42(1):55-61.

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(1):53-60.

Kohnke H, Sorlin K, Granath G, Wadelius M. Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005a; 61:381-8.

Lefrere JJ, Horellou MH, Conard J, Samama M. Proposed classification of resistances to oral anticoagulant therapy. *J Clin Pathol.* 1987; 40:242-3.

Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* 2007; 7:154–79.

Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2004; 427:541-4.

Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, et al (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium). Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood.* 2010; 115(18):3827-34.

Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H, Vecsler M, Lubetsky A, Rechavi G, et al. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood.* 2007; 109(6):2477-80.

Lorenzi TF, D'Amico E, Daniel MM, Silveira PAA, Buccheri V. *Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica.* Cap. 9, pag 595-608, 3a edição. Rio de Janeiro: Editora Medsi; 2003.

Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; 23(4):223-35.

Maffei FHA. The evolution of the anticoagulant treatment of venous thromboembolism. *J Vasc Br.* 2002; 1(2):85-6.

Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: Gene–environment interactions. *Human Genomics* 2010; 4: 238–249.

Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina*, 2006. 39 (4): 515-21.

Micromedex. Drug-Reax System (2010) Internet database. Disponível em: www-micromedexsolutions-com.ez27.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/PFDefaultActionId/evidencexpert.ShowDrugInteractionsResults. Acessado em 17 de junho de 2013.

Paschôa AF. Impacto da pesquisa laboratorial de trombofilia na prevenção secundária e orientação dos doentes com tromboembolismo venoso [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana ISC, Rangel F, Ojopi EB, et al. Pharmacogenetics of Warfarin: Development of a Dosing Algorithm for Brazilian Patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 84(6):722-8.

Pharmacogenomics Knowledge Base - PharmGKB [homepage na Internet]. Stanford: Stanford University; [atualizada em 23 de maio de 2011; acesso em 01 de fevereiro de 2012]. Pathway - Warfarin Pathway, Pharmacodynamics. Disponível em <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011114>.

Pharmacogenomics Knowledge Base - PharmGKB [homepage na Internet]. Stanford: Stanford University; [atualizada em 23 de maio de 2011; acesso em 01 de fevereiro de 2012]. Pathway - Warfarin Pathway, Pharmacokinetics. Disponível em <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011113?previousQuery=warfarin>.

Prasad V, Kaplan RM, Passman RS. New Frontiers for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. 2012; 33(3):199-208.

Richard P, Thomas G, de Zulueta MP, De Gennes JL, Thomas M, Cassaigne A, et al. Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. Clin Chem. 1994; 40(1):24-9.

Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. N Engl J Med. 2005; 352(22):2285-93.

Rizzatti EG, Franco RF. Treatment of venous thromboembolism. Medicina. 2001; 34:269-75.

Rollo HA, Maffei FHA. Profilaxia da trombose venosa e da embolia pulmonar. In: Lopes, AC (Ed). 1ª edição. Diagnóstico e tratamento. Barueri: Editora Manole; 2006. p. 131-8.

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature. 2004; 427:537-41.

Sabino AP. Eventos trombóticos venosos e arteriais: avaliação de fatores genéticos predisponentes em pacientes atendidos em serviço médico especializado em hemostasia [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade federal de Minas Gerais; 2005.

Sabol, BJ; Basa, RR; Wilkins, CE. Malabsorption-associated warfarin resistance. Am J Health Syst Pharm, 2009. 66(17):1548-53.

Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Biol Pharm Bull. 2002; 25(11):1391-400.

Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? Drug Metab Pharmacokinet. 2005; 20(6):391-414.

Santos FC, Maffei FHA, Carvalho LR, Tomazini-Santos IP, Gianini M, Sobreira ML, et al. Complicações da terapia anticoagulante com warfarina em pacientes com doença vascular periférica: estudo coorte prospectivo. J Vasc Bras, 2006; 5(3):194-202.

Santos PCJL, Soares RAG, Santos DBG, Nascimento RM, Coelho GLLM, Nicolau JC, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet.* 2011; 12:13.

Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eapá CB, Ganey VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *J Clin Pharm Therap.* 2007; 32:641-9.

Schafer AI. Warfarin for Venous Thromboembolism - Walking the Dosing Tightrope. *N Engl J Med.* 2003; 348(15):1478-80.

Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Desnick RJ. Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish populations. *Am J Hum Genet.* 2008; 82(2):495-500.

Sinxadi M, Blockman M. Warfarin resistance. *Cardiovasc J Afr.* 2008; 19:215-7.

Smith SA, Morrissey JH. Properties of recombinant human thromboplastin that determine the International Sensitivity Index (ISI). *J Thromb Haemost.* 2004; 2:1610-6.

Sussman NL, Walterschied M, Butler T, Cali JJ, Riss T, Kelly JH. The predictive nature of high throughput toxicity screening using a human hepatocyte cell line. *Cell Notes.* 2002; 3:7-10.

Talstad I, Gamst ON. Warfarin resistance due to malabsorption. *J Intern Med.* 1994; 236:465-7.

Tassies D, Freire C, Pijoan J, Maragall S, Monteagudo J, Ordinas A, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and satability of anticoagulation. *Haematologica.* 2002; 87:1185-91.

Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood.* 2000; 96(5):1816-9.

The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med.* 2009; 360:753-64

Tondato F. Interação de fármacos e alimentos com warfarina. *Rev Soc Cardiol.* 2004; 5: 770-8.

U.S. Food and Drug Administration [homepage na Internet]. Silver Spring: U.S. Food and Drug Administration; [atualizada em 18/06/2009; acesso em 13/12/2011]. FDA approves updates warfarin (Coumadin) prescribing information: new genetic information may help providers initial dosing estimates of the anticoagulation for individual patients. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm>.

Vianna JR, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76(1):18-26.

Yuan, HY; Chen, JJ; Lee, MTM; Wung, JC; Chen, YF; Charng, MJ; et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Gen.* 2005; 14(3):1745-51.

Yoshida WB, Dib RP, Yoshuda RA, Maffei FHA. Ximelagatran versus Warfarin for prophylaxis of venous thromboembolism in major orthopedic surgery: systematic review of randomized controlled trials. *Sao Paulo Med J.* 2006;124(6):355-61.

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

Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 2005; 5:262-70.

Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet.* 2007; 121:23-34.

Wadelius M, Chen LY, Lindh JC, Eriksson N, Ghorri MJR, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*. 2009; 113(4):784-92.

Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Sittinger K, Spohn G, Rost S, et al. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(1):109-18.

Wofford JL, Wells MD, Singh S. Best strategies for patient education about anticoagulation with warfarin: a systematic review. *BMC Health Services Research*. 2008; 8:40.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia - Fundamentos e prática*. Cap. 77, p.855-875; Cap. 83, p.952-959 – SP. Atheneu, 2001. 1081p.

Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R, et al. Estimation of Warfarin Maintenance Dose Based on VKORC1 (1639GA) and CYP2C9 Genotypes. *Clin Chem*. 2007; 53(7):1199-205.

Zoler ML. Genetic effects on warfarin dosing undergo fine-tuning. *N Engl J Med*. 2008 March.

9 ANEXOS

9.1 Ficha Clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Genética Animal e Humana



FICHA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: “ESTIMATIVA DA DOSE DE MANUTENÇÃO DE VARFARINA BASEADA EM DETERMINANTES GENÉTICOS”

PROTOCOLO: _____

Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: M___/F___ Naturalidade: _____

Endereço: Rua/Avenida: _____ Nº: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____

Tel. residencial: () _____ Tel. celular: () _____

Email: _____

Escolaridade: ___ nenhum ___ 1º grau ___ 2º grau ___ 3º grau ___ pós graduação

Médico assistente: _____

DADOS CLÍNICOS:

1. Idade _____

2. Peso _____ Altura _____ IMC _____ (não preencher)

3. Indicação terapêutica da anticoagulação: _____

4. Tempo existente de tratamento: _____

5. Usa outros medicamentos? ___ Sim ___ Não. Qual (is): _____

6. Apresenta sangramento com frequência? ___ Sim ___ Não.

Se sim: ___ Manchas roxas na pele ___ Nariz ___ Menstruação aumentada
___ Corte com sangramento prolongado ___ Gengiva ___ Outro

7. História familiar de resistência à varfarina: ___ Sim ___ Não Parentesco: _____

8. Ingere bebidas alcoólicas? ___ Não ___ Raramente ___ Fim de semana ___ Diariamente

12. Outras patologias: ___ Sim ___ Não. Qual (is): _____

Continuação

Nome: _____ Protocolo: _____

Dados de dosagens de varfarina e RNI:

Data	Dose (mg) semanal de varfarina	Esquema dose	RNI	Fontes de variação	Adesão ao tratamento: marcar se aconteceu algum dos itens:
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____
				N A I M	Esqueci de tomar ___ dias Tomei dose errada de _____

N – Não ocorreu A – Alimentação I – Infecção M – Medicamentos

Estimativa do consumo de vitamina K por semana

Alimento	Porção de	Nº de porções por semana
Brocólis	½ xícara	
Couve - bruxelas	½ xícara	
Repolho	½ xícara	
Couve-flor	½ xícara	
Grão de bico	½ xícara	
Pepino com casca	½ xícara	
Ervilha	½ xícara	
Nabo	½ xícara	
Mostarda	½ xícara	
Couve	½ xícara	
Alface	1 xícara	
Aspargo	½ xícara	
Espinafre	½ xícara	
Outros vegetais folhas verdes	½ xícara	
Atum	1 xícara	
Óleo de soja ou canola	1 colher de sopa	
Óleo de oliva ou algodão	1 colher de sopa	
Suplemento de vitamina K	Dose: _____	

Notas:

1. Os itens 6, 7 e 8 não foram analisados, devido n amostral pequeno entres os seus respectivos grupos e também pela ausência de informação em número elevado de indivíduos.
2. Os dados referentes à estimativa de consumo de vitamina K foram coletados, porém não analisados, devido às dificuldades de padronização de medida e ao esquecimento dos indivíduos quanto à alimentação dos dias anteriores.

9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Genética Animal e Humana



APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: “ESTIMATIVA DA DOSE DE MANUTENÇÃO DE VARFARINA BASEADA EM DETERMINANTES GENÉTICOS”

Prezado (a) Sr.(a),

A varfarina, o anticoagulante oral mais usado no Brasil, tem seu efeito farmacológico dependente da ingestão de vitamina K, etnia, gênero, idade, peso corporal, uso de outros medicamentos e fatores genéticos. Por isto, o uso da varfarina pode se tornar difícil e causar graves efeitos colaterais, como hemorragias ou trombozes. O objetivo deste trabalho é encontrar fatores que interferem na dose de varfarina e, então, calcular a melhor dose de varfarina para cada paciente. Isso poderá ajudar a diminuir o número de casos de pacientes com efeitos colaterais.

Gostaríamos de convidá-lo para participar desta pesquisa como voluntário (a), sem custo algum pelos exames realizados. É possível que você não venha a se beneficiar diretamente dos resultados deste projeto, mas certamente contribuirá para que novos pacientes venham futuramente se beneficiar. Se você não quiser participar, não haverá qualquer problema no seu tratamento e assistência recebida pelo seu médico. Se você quiser participar, deverá autorizar a coleta de um tubo do seu sangue. Essa coleta será feita utilizando material descartável de boa qualidade. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

A coordenadora do projeto é a Profa. Dra. Ana Lúcia Brunilat Godard e será desenvolvido no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todo o material biológico, após a extração de DNA, será descartado segundo normas da Vigilância Sanitária. Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo, por favor, entre em contato pelo telefone 3409-2594 com a Profa. ANA LÚCIA BRUNIALTI GODARD ou com a bioquímica Vanessa Cristina de Oliveira, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Eu, _____, concordo em participar do trabalho “ESTIMATIVA DA DOSE DE MANUTENÇÃO DE VARFARINA BASEADA EM DETERMINANTES GENÉTICOS”. Eu declaro que fui orientado das finalidades da pesquisa e que não terei nenhum ônus em participar desta. Eu concordo com a coleta de sangue em mim ou em membros da minha família para o estudo acima citado.

Se você estiver de acordo, por favor, assine abaixo.

De acordo: _____

(Assinatura)

Nome: _____

Data: / / _____

RG: _____

Comitê de ética em pesquisa –COEP – UFMG – Parecer 334/08

Av. Presidente Antônio Carlos 6627 – Prédio da Reitoria 7 andar sala 7018 – CEP 31270-901 Tel. (31) 3499 4592

9.3 Parecer ETIC 334/08



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

Parecer nº. ETIC 334/08

Interessado(a): **Profa. Ana Lúcia Brunialti Godard**
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 1º de dezembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estimativa da dose de manutenção de varfarina baseada em determinantes genéticos**" 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.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG