

TESIS DOCTORAL

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Programa Oficial de Doctorado en Farmacia

Línea de Investigación Farmacia Social



DOCTORANDO

ENRIQUE JIMÉNEZ VARO

DIRECTORES

MARISA CAÑADAS GARRE

MIGUEL ÁNGEL CALLEJA HERNÁNDEZ

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Enrique Jiménez Varo
D.L.: GR 341-2015
ISBN: 978-84-9083-347-6

Dña. Marisa Cañadas Garre. Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Técnico de apoyo del Sistema Nacional de Salud. Coordinadora de la Unidad de Farmacogenética del Hospital Universitario de Granada, Complejo Hospitalario de Granada.

Don Miguel Ángel Calleja Hernández. Doctor en Farmacia. Profesor e investigador de la Universidad de Granada. Jefe de Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Granada, Complejo Hospitalario de Granada.

Como Directores de la Tesis

“MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL”

Certifican que:

El trabajo ha sido realizado por el doctorando Enrique Jiménez Varo bajo nuestra dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste, se expide en Granada en Septiembre de 2014.

Dra. Marisa Cañadas Garre

Dr. Miguel Ángel Calleja Hernández

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS EN ESPAÑOL

ABCB1:	Gen que codifica la glicoproteína-P
ACO:	Anticoagulante oral
AIT:	Accidente isquémico transitorio
APOE:	Apolipoproteína E
AVK:	Antagonistas de la vitamina K
CHG:	Complejo Hospitalario de Granada
CT:	Cohorte total de pacientes
CYP2C9*2:	Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 9. Variante alélica 2
CYP2C9*3:	Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 9. Variante alélica 3
CYP2C19*2:	Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 19. Variante alélica 2
CYP2C19*17:	Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 19. Variante alélica 17
CYP4F2:	Familia 4 del citocromo P-450. Subfamilia F. Polipéptido 2.
ETEVE:	Enfermedad tromboembólica venosa
EU-PACT:	European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy
F:	Primer Forward
FA:	Fibrilación auricular
GGCX:	Gamma-Glutamil-Carboxilasa
IC _{95%} :	Intervalo de Confianza al 95%
IMC:	índice de masa corporal
INR:	Ratio Internacional Normalizada
MAE:	Error absoluto medio
ME:	Error medio
NNG:	Número necesario para genotipar
OR:	Odds Ratio
p:	Nivel de significación
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
R:	Primer Reverse
R ² :	Coefficiente de determinación
RFLP:	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RR:	Riesgo relativo
rs:	Polimorfismo de referencia
TAO:	Tratamiento de anticoagulación oral
TER:	Tiempo por encima del rango terapéutico
TDR:	Tiempo por debajo del rango terapéutico
VKORC1:	Vitamina K epóxido reductasa complejo 1.

0. ÍNDICE

0. ÍNDICE	1
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. PRINCIPALES INDICACIONES PARA LA TERAPIA DE ANTICOAGULACIÓN ORAL	13
2.2. MANEJO DE LA TERAPIA ANTITROMBÓTICA	13
2.2.1. ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K EN FIBRILACIÓN AURICULAR	13
2.2.2. ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K EN ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA	14
2.2.3. ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K EN PORTADORES DE PRÓTESIS VALVULARES CARDIACAS	14
2.3. FARMACOLOGÍA DE LOS ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K	14
2.3.1. ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K	15
2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K	15
2.3.3. DIFERENCIAS ENTRE LOS ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K	16
2.4. FARMACOGENÉTICA DE LOS ANTAGONISTAS DE LA VITAMINA K	16
2.4.1. PRINCIPALES GENES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL	17
2.4.2. OTROS GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA ANTICOAGULANTE	19
2.4.3. INFLUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA EFICACIA Y SEGURIDAD	21
2.4.4. APLICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN GENÉTICA. DESARROLLO ALGORITMOS DE DOSIFICACIÓN	25
2.4.5. VALIDACIÓN EXTERNA DE LOS ALGORITMOS FARMACOGENÉTICOS	27
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3.1. HIPÓTESIS	31
3.2. OBJETIVO GENERAL	31
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGÍA	35
4.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL	35
4.1.1. DISEÑO	35
4.1.2. POBLACIÓN DIANA	35
4.1.3. ÁMBITO DE ESTUDIO	35
4.1.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	35
4.1.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	36
4.1.6. FUENTES DE INFORMACIÓN	36
4.1.7. VARIABLES	36
4.1.8. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN PERFILES FARMACOGENÉTICOS	37
4.1.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41

4.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL	42
4.2.1. DISEÑO	42
4.2.2. POBLACIÓN DIANA	42
4.2.3. ÁMBITO DE ESTUDIO	42
4.2.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	42
4.2.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	42
4.2.6. FUENTES DE INFORMACIÓN	42
4.2.7. VARIABLES	43
4.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
4.2.9. CONSTRUCCIÓN DE LOS ALGORITMOS	44
4.2.10. EXACTITUD PREDICTIVA Y RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS ALGORITMOS	44
5. RESULTADOS	49
5.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL	49
5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	49
5.1.2. TIEMPO DENTRO/ENCIMA/ DEBAJO DEL RANGO TERAPÉUTICO DE INR Y ALCANCE DE LA ESTABILIDAD ANTICOAGULANTE	50
5.1.3. ANÁLISIS GENÉTICO	51
5.1.4. INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL TIEMPO DENTRO/ENCIMA/DEBAJO DE RANGO TERAPÉUTICO DE INR	52
5.1.5. INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL ALCANCE DE LA ESTABILIDAD ANTICOAGULANTE Y TIEMPO NECESARIO HASTA ALCANZAR ESTABILIDAD ANTICOAGULANTE	56
5.1.6. INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL RIESGO DE SOBREALICACIÓN Y DE EVENTOS HEMORRÁGICOS	57
5.1.7. PERIODO 1-7 MESES	61
5.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL	64
5.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	64
5.2.2. ANÁLISIS GENOTÍPICO	65
5.2.3. REQUERIMIENTO DE DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y GENÉTICAS	66
5.2.4. CONSTRUCCIÓN DEL ALGORITMO FARMACOGENÉTICO PARA LA PREDICCIÓN DE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y GENÉTICAS	68
5.2.5. CAPACIDAD PREDICTIVA DE LOS MODELOS CLÍNICO Y FARMACOGENÉTICO	70
5.2.6. EXACTITUD PREDICTIVA DE LOS ALGORITMOS	71
5.2.7. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS ALGORITMOS	71
6. DISCUSIÓN	77

6.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL	77
6.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL	83
7. CONCLUSIONES	91
7.1. CONCLUSIONES INDIVIDUALES	91
7.1.1. CONCLUSIONES PARTE I	91
7.1.2. CONCLUSIONES PARTE II	93
7.2. CONCLUSIONES GENERALES	94
7.2.1. PARTE I	94
7.2.2. PARTE II	95
8. REFERENCIAS	99
9. ANEXOS	113
9.1. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	113
9.1.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS	113
9.1.2. CAPÍTULOS DE LIBROS	113
9.1.3. COMUNICACIONES A CONGRESOS	114

RESUMEN

1. RESUMEN

Los antagonistas de la vitamina K, warfarina (USA y parte de Europa) y acenocumarol (España y algunos países de Europa), son los anticoagulantes orales más prescritos en la prevención y tratamiento de eventos tromboembólicos en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa y en pacientes portadores de prótesis valvulares cardíacas.

El manejo del tratamiento de anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K es complicado debido a que las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas conducen a una respuesta variable e impredecible en cada paciente. Por ello, la actividad anticoagulante se monitoriza periódicamente mediante la prueba de laboratorio INR (International Normalized Ratio), con el objetivo de mantener el INR dentro de rango terapéutico correspondiente a cada indicación.

El comienzo del tratamiento de anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K es el periodo más problemático, ya que el riesgo de eventos tromboembólicos (asociado a $INR < 2$) y hemorrágicos (asociado a $INR > 4$) es mayor en los primeros meses de tratamiento, debido a que cada paciente requiere una dosis individualizada para alcanzar la estabilidad anticoagulante que es desconocida al comienzo del tratamiento de anticoagulación oral y que debe ser ajustada empíricamente en base a los parámetros clínicos y en función del valor de INR obtenido, hasta el alcance de la dosis estable.

La variabilidad interindividual al tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol depende de varios factores, como son edad, sexo, peso, índice de masa corporal (IMC), medicación concomitante (inductores o inhibidores de CYP-450), otras enfermedades asociadas, alcohol, tabaquismo e ingesta de vitamina K. Además de los factores sociodemográficos y clínicos, los factores genéticos juegan un papel importante en la variabilidad interindividual de la dosis de acenocumarol. Las variantes alélicas más estudiadas se encuentran en los genes que codifican la principal isoenzima de metabolización (CYP2C9) y la vitamina K epóxido reductasa complejo 1 (VKORC1), diana terapéutica de los antagonistas de la vitamina K. Al menos el 50% de la variabilidad en la dosis necesaria de estos viene determinada por estos factores. Por otro lado, variantes alélicas en otros genes, tales como CYP4F2, ABCB1, APOE, CYP2C19 y GGCX, pueden mostrar influencia en la seguridad y eficacia del tratamiento de anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K.

La eficacia y la seguridad del tratamiento de anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K se han asociado al tiempo que permanecen los pacientes dentro del rango terapéutico. Por lo tanto, manteniendo al paciente dentro del rango terapéutico de INR se

puede disminuir el riesgo de reacciones adversas. En este sentido, la determinación de polimorfismos genéticos que se encuentren asociados a estos parámetros puede ser de utilidad en la mejora del manejo del tratamiento de anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido mejorar la farmacoterapia (seguridad y eficacia) del inicio del tratamiento con anticoagulantes, mediante la determinación de polimorfismos genéticos más relevantes (CYP2C9 y VKORC1) y aquellos genes que se han estudiado en menor medida.

Para alcanzar el objetivo de mejorar la seguridad, se evaluó la asociación entre los polimorfismos genéticos CYP2C9 (rs1799853 y rs1057910), VKORC1 (rs9923231), CYP4F2 (rs2108622), ABCB1 (rs1045642), APOE (rs429358 y rs7412), CYP2C19 (rs4244285 y rs12248560) con la seguridad del tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol en 128 pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa. El parámetro seguridad fue medido como el tiempo dentro/fuera de rango de INR terapéutico, alcance de la estabilidad anticoagulante, tiempo necesario hasta alcanzar la estabilidad, sobreanticoagulación (INR>4) y eventos hemorrágicos producidos durante los primeros 7 meses de tratamiento. Después del primer mes de tratamiento, el alelo T para el gen VKORC1 y el genotipo APOE-E3/E3 se asociaron de forma independiente a un mayor tiempo por encima del rango terapéutico y menor tiempo por debajo del rango terapéutico (R^2 :0.370 y R^2 :0.239, respectivamente). Después de siete meses, el alelo T para VKORC1 predijo mayor tiempo por encima del rango terapéutico, y también se asoció a un aumento de INR>4, particularmente el genotipo TT (OR: 32; IC₉₅%: 6-175, $p=8\cdot 10^{-5}$). El alelo C de CYP2C9*3 (OR: 5,5; IC₉₅%:1.8-17, $p=0.003$) y el alelo C para ABCB1 C3435T (OR: 8.9; IC₉₅% :1.1-70, $p = 0.039$) influyeron de forma independiente en una mayor incidencia de INR>6. Los pacientes VKORC1-TT/ABCB1-C permanecieron 26,8% del tiempo por encima del rango terapéutico, con un riesgo relativo (RR) asociado para INR>4 de 1.8 (IC₉₅%:1.2-2, 0.5, $p=0.015$). Además, los pacientes con el genotipo TT para VKORC1 presentaron mayor riesgo de eventos hemorrágicos (RR: 3.5; IC₉₅%:1.4-8 0.4, $p=0.010$).

Una vez analizada la influencia de los polimorfismos genéticos con la seguridad al tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol en los primeros 7 meses de tratamiento, el siguiente objetivo de esta Tesis Doctoral se centró en la mejora de la eficacia mediante la elaboración de un algoritmo farmacogenético que incluyese parámetros sociodemográficos, clínicos y farmacogenéticos (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, ABCB1, APOE, CYP2C19 y GGX). Se realizó un estudio observacional retrospectivo en una cohorte de 164 pacientes diagnosticados

de FA/EDEV tratados con dosis estables de acenocumarol. La cohorte total de pacientes se distribuyó aleatoriamente en dos grupos; cohorte de derivación (n=134 pacientes) y cohorte de validación (30 pacientes). El algoritmo farmacogenético se obtuvo mediante regresión lineal múltiple procedente de la cohorte derivación y fue validado internamente en la cohorte de validación. Este modelo incluyó las siguientes variables: edad, IMC, amiodarona concomitante y CYP2C9, VKORC1 y APOE. Fue capaz de explicar hasta un 56.6% del total de la variabilidad en la dosis estable acenocumarol. Además, clasificó correctamente al 67% de los pacientes con una desviación en la predicción de la dosis real $\leq 20\%$.

En conclusión, los genotipos de VKORC1 (alelo T), CYP2C9*3 (alelo C), APOE (E3/E3) y ABCB1 (alelo C) deberían ser considerados para la prevención de reacciones adversas, especialmente en el inicio del tratamiento con acenocumarol. Por otro lado, el modelo farmacogenético desarrollado en esta Tesis mejora en un 42.6% al modelo clínico y presenta una precisión 1.5 veces mayor en la predicción de la dosis de acenocumarol, siendo capaz de clasificar correctamente hasta el doble de pacientes que el algoritmo clínico.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Principales indicaciones para la terapia de anticoagulación oral

Desde 1950, los antagonistas de la vitamina K (AVK) (warfarina, acenocumarol y fenprocumon) han sido la piedra angular para la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes con fibrilación auricular (FA), enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) y en pacientes con prótesis valvulares cardíacas (1-7). Warfarina se prescribe sobre todo en EE.UU., Canadá y algunos países europeos, mientras que acenocumarol es el anticoagulante oral ampliamente utilizado en España y los Países Bajos (8).

2.2. Manejo de la terapia antitrombótica

2.2.1. Antagonistas de la vitamina K en fibrilación auricular

La fibrilación auricular es el trastorno del ritmo cardiaco más común, con el principal riesgo asociado de sufrir un ictus. El riesgo de ictus isquémico aumenta hasta cinco veces en los pacientes con FA (9). Iniciar terapia de anticoagulación oral de larga duración depende de los factores de riesgo de ictus que presenta el paciente. El riesgo de recurrencia de ictus que presenta el paciente se encuentra estratificado en función de la clasificación CHADS₂ (C: insuficiencia cardíaca congestiva, H: hipertensión arterial, A: edad \geq 65 años, D: diabetes mellitus o S: ictus previo) (1, 9-11). Este sistema asigna dos puntos a ictus previo y un punto al resto de condiciones.

Otros factores de riesgo son: sexo femenino, edad comprendida entre 65-74 años, y enfermedad vascular. Posteriormente, la clasificación CHADS₂ fue modificada hacia CHA₂DS₂-VASc (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, edad \geq 75 [doble], diabetes mellitus, ictus previo [doble], enfermedad vascular, edad comprendida entre 65-74 años y sexo femenino). Esta modificación incluye nuevos parámetros que mejoran la evaluación del riesgo de ictus del paciente, especialmente para aquéllos que se encontraban clasificados con la puntuación CHADS₂<2. De acuerdo con esta nueva clasificación, la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) elaboró una guía de recomendaciones de anticoagulación oral con AVK en función de la puntuación CHA₂DS₂-VASc obtenida (9):

- CHA₂DS₂-VASc \geq 2: Iniciar tratamiento con AVK con una dosis ajustada para mantener el rango terapéutico de INR entre 2-3.
- CHA₂DS₂-VASc = 1: Iniciar tratamiento con AVK con una dosis ajustada para mantener el rango terapéutico de INR entre 2-3 o antiagregación plaquetaria con aspirina a dosis

de entre 75-325 mg/día. Preferiblemente anticoagulación oral a antiagregación plaquetaria.

- CHA2DS2-VASc = 0: Iniciar antiagregación plaquetaria con aspirina a dosis de entre 75-325 mg/día o no terapia antitrombótica. Preferiblemente antiagregación plaquetaria a no terapia antitrombótica.

2.2.2. Antagonistas de la vitamina K en enfermedad tromboembólica venosa

El tratamiento anticoagulante con AVK es eficaz en la prevención de trombosis venosa recurrente en pacientes con ETEV. Este tratamiento se inicia protocolariamente con heparina de bajo peso molecular o heparina no fraccionada y la terapia anticoagulante oral. La terapia puente con heparina de bajo peso molecular o con heparina no fraccionada se recomienda mantener hasta alcanzar el rango terapéutico de INR (2)

Se recomienda mantener tratamiento anticoagulante durante tres meses en pacientes con trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar cuando el riesgo de sangrado es alto; si el riesgo de sangrado es bajo-moderado, se recomienda prolongar el tratamiento con anticoagulante oral. El rango terapéutico de INR recomendado en ETEV es de 2-3 (2).

2.2.3. Antagonistas de la vitamina K en portadores de prótesis valvulares cardiacas

El riesgo de tromboembolismo en los primeros meses después de la implantación de una válvula protésica es particularmente alto (12).

La guía de práctica clínica Americana para el tratamiento y prevención de trombosis en pacientes portadores de válvulas cardiacas recomienda (13):

En los primeros 3 meses después de implantación de la prótesis, aspirina para las válvulas aórticas y terapia antitrombótica con antagonistas de la vitamina K manteniendo rango terapéutico de INR en 2.5 para las válvulas mitrales. Después de 3 meses, se sugiere terapia con aspirina. Se recomienda terapia puente con heparina de bajo peso molecular o heparina no fraccionada en pacientes con válvulas mecánicas. Se recomienda terapia de larga duración con antagonistas de la vitamina K para todas las válvulas mecánicas, manteniendo INR en 2.5 para válvulas aórticas e INR de 3.0 para válvula mitral o doble prótesis valvular.

En pacientes con válvulas mecánicas con riesgo de sangrado bajo, se recomienda la adición de aspirina a dosis baja (50-100 mg/día). En pacientes con reparación de la válvula, se sugiere terapia con aspirina.

Después de los primeros 6 meses, el riesgo de sangrado se reduce en gran medida si el paciente es adherente al tratamiento y cumple con las pautas de dosificación (12).

2.3. Farmacología de los antagonistas de la vitamina K

2.3.1. Antagonistas de la vitamina K

2.3.1.1. Warfarina

Warfarina es el anticoagulante oral más prescrito a nivel mundial. Es un derivado cumarínico derivado de la 4-hidroxicumarina, núcleo con estructura similar a la vitamina K. Se administra como una mezcla racémica del enantiómero R- y enantiómero S-(14). El enantiómero S tiene una actividad anticoagulante de 3 a 5 veces mayor que el enantiómero R-warfarina (14). El enantiómero S-warfarina se metaboliza principalmente por la isoenzima CYP2C9. Aunque el enantiómero R-warfarina también se metaboliza a través de la vía de CYP2C9, hay otras isoenzimas menores que participan en el metabolismo de este enantiómero, tales como CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C18 y CYP2C19 (15-17).

2.3.1.2. Acenocumarol

Acenocumarol es un análogo 4-Nitro de warfarina, que se prescribe en muchos países europeos (8, 18, 19). Se administra por vía oral como una mezcla racémica de enantiómeros R- y S-. La biotransformación se realiza en el hígado a través del citocromo P450. La isoenzima más importante del metabolismo de este fármaco es la isoenzima CYP2C9, que realiza una hidroxilación en la posición 6 -, 7 - y 8 - de ambos enantiómeros. El enantiómero S se metaboliza rápidamente ($t_{1/2} < 2h$). La actividad anticoagulante depende de enantiómero R-acenocumarol que presenta un $t_{1/2}$ de aproximadamente 8h. A diferencia del enantiómero S-acenocumarol, el enantiómero R-acenocumarol también es metabolizado por otras isoenzimas menores como CYP1A2, CYP3A5 y CYP2C19 (20).

2.3.1.3. Fenprocumon

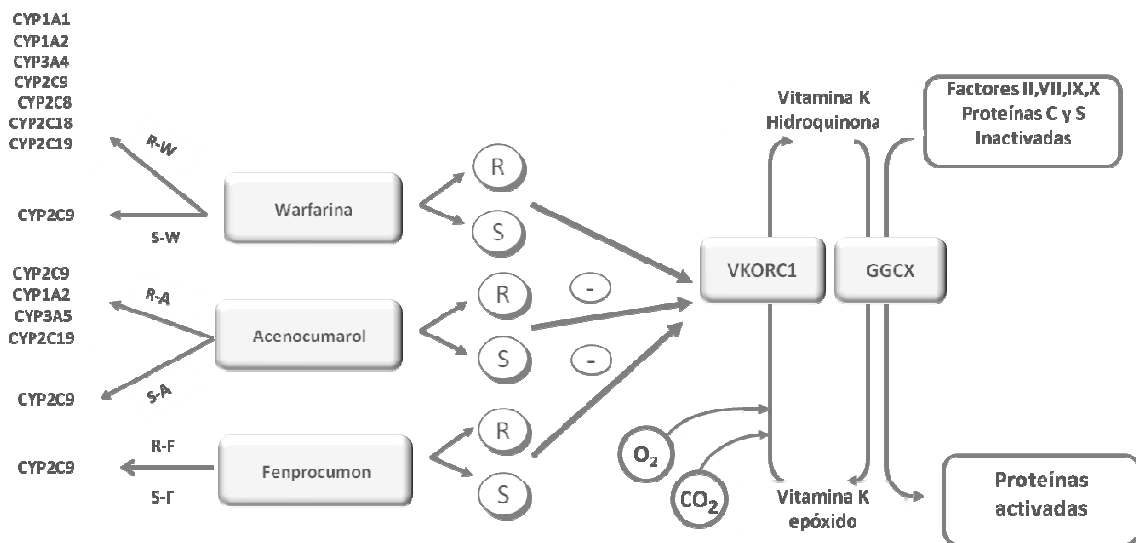
Al igual que los otros derivados cumarínicos, fenprocumon se administra como una mezcla racémica de los enantiómeros S- y R-. La biodisponibilidad de fenprocumon es del 90% y se metaboliza estereoselectivamente a través del citocromo P-450 a metabolitos inactivos hidroxilados (21). Las principales isoenzimas en el metabolismo de fenprocumon son CYP2C9 y CYP3A4 (22). Los dos enantiómeros de fenprocumon presentan un tiempo de vida media de alrededor de 110-130h tras la primera administración (23).

2.3.2. Mecanismo de acción de los antagonistas de la vitamina K

Los antagonistas de la vitamina K ejercen su efecto mediante la inhibición de la vitamina K epóxido reductasa complejo 1 (VKORC1), bloqueando la regeneración de vitamina K reducida (24). La vitamina K es un cofactor esencial en la carboxilación de residuos de glutamato en la

región N-terminal de las proteínas dependientes de vitamina K, la síntesis de factores de coagulación dependientes de la vitamina K (factores II, VII, IX y X) y proteínas fibrinolíticas, tales como proteínas C y S (Figura 1)(25). Estas proteínas dependientes de la vitamina K son inhibidas por la acción de los derivados de cumarínicos. Al antagonizar estos factores de coagulación dependientes de la vitamina K se impide la interacción entre estos factores y el calcio presente en el subendotelio vascular. La inhibición de los factores de coagulación causa bajos niveles plasmáticos de protrombina, encargada de generar la formación de fibrina necesaria para activar la coagulación (26).

Figura 1. Mecanismo de acción de los antagonistas de la vitamina K



2.3.3. Diferencias entre los antagonistas de la vitamina K

Las diferencias entre estas moléculas se encuentran en sus propiedades farmacocinéticas. Acenocumarol presenta un tiempo de vida media de 8 a 11 horas, mientras que el tiempo de semivida de warfarina es cuatro o cinco veces la vida media de acenocumarol (34-42 horas), alcanzando el pico máximo de concentración plasmática a los 90 minutos después de la administración oral; mientras que fenprocumón presenta un tiempo de semivida de 110h-130h después de la administración inicial oral (22).

2.4. Farmacogenética de los antagonistas de la vitamina K

Los derivados cumarínicos son eficaces en el tratamiento y prevención de eventos tromboembólicos en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular, trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar y en pacientes portadores de prótesis valvulares cardíacas. Sin embargo, el manejo de la terapia anticoagulante oral en el inicio del tratamiento es complicado, debido a que presentan margen terapéutico estrecho y alta variabilidad

interindividual en la respuesta anticoagulante. La actividad anticoagulante se monitoriza a través de un test de laboratorio que estandariza los valores obtenidos a través del tiempo de protrombina, denominado INR (International Normalized Ratio). El comienzo de la terapia anticoagulante es el periodo más problemático debido al riesgo de trombos (asociado a un INR <2) y el riesgo de hemorragia (asociado a INR > 4) es mayor en los primeros tres meses, ya que cada paciente requiere dosis individualizadas para lograr la estabilidad, y se desconoce dicha dosis (27).

Actualmente, la dosis inicial de los derivados cumarínicos se basa en parámetros clínicos y ajuste de dosis mediante titulación en función del valor de INR obtenido. El primer control del INR se realiza aproximadamente al día 3 ó 4 después de iniciar terapia anticoagulante. Dependiendo del valor de INR obtenido, la dosis inicial se incrementa, disminuye o se mantiene hasta que se obtienen tres valores de INR consecutivos dentro del rango terapéutico con una variación en la dosis menor al 10%, que se considera dosis estable. El reto principal de la terapia anticoagulante oral con antagonistas de la vitamina K es alcanzar y mantener al paciente dentro de rango terapéutico de INR. Los pacientes tratados con anticoagulantes orales requieren monitorización constante para asegurar que la anticoagulación sea estable.

La variabilidad interindividual al tratamiento anticoagulante oral con derivados cumarínicos depende de varios factores, como son edad, sexo, peso, índice de masa corporal (IMC), medicación concomitante (inductores o inhibidores de CYP-450), otras enfermedades asociadas, alcohol, tabaquismo e ingesta de vitamina K. Además de los factores sociodemográficos y clínicos, los factores genéticos juegan un papel importante en la variabilidad interindividual de la dosis de acenocumarol. Las variantes alélicas más estudiadas se encuentran en CYP2C9 y VKORC1. Al menos el 50% de la variabilidad en la dosis necesaria de los AVKs viene determinada por estos factores (28-32). Por otro lado, variantes alélicas en otros genes, tales como CYP4F2, ABCB1, APOE, CYP2C19 y GGCX, pueden mostrar influencia en la seguridad y eficacia del anticoagulante oral con derivados cumarínicos (33-38).

Por todas estas razones, los derivados cumarínicos se han considerado como un objetivo ideal para el desarrollo de la medicina personalizada. La medicina personalizada de anticoagulación oral se centra en la búsqueda de marcadores genéticos que pueden mejorar la farmacoterapia en términos de eficacia y seguridad.

2.4.1. Principales genes involucrados en la respuesta a la anticoagulación oral

Las variaciones genéticas más estudiadas corresponden a genes que codifican principal isoenzima de metabolización: CYP2C9, y la diana terapéutica de antagonistas de vitamina K:

VKORC1. Las variaciones genéticas en estos dos genes son responsables de aproximadamente el 30% de la variabilidad en la dosis requerida (39, 40).

2.4.1.1. CYP2C9

CYP2C9 se encuentra en hígado y es una de las isoenzimas con mayor relevancia en el metabolismo de fármacos. Es responsable de aproximadamente el 15% de los fármacos que se someten a metabolismo de fase I (41).

Los dos polimorfismos más comunes descritos en CYP2C9 son CYP2C9*2 (Arg144Cys; rs1799853) y CYP2C9*3 (Ile359Leu; rs1057910). Estas variantes alélicas codifican enzimas con actividad reducida de 12% y 5%, respectivamente, en comparación con el alelo ancestral o wild-type (15, 42-44). Los portadores de alguna variante alélica en CYP2C9*2/*3 tienen más riesgo de sobreanticoagulación (asociado a riesgo de hemorragia), requieren dosis más bajas y necesitan más tiempo para alcanzar estabilidad anticoagulante comparado con los pacientes wild-type que los pacientes de tipo salvaje para este gen (45, 46).

Las frecuencias de estas variantes alélicas difieren entre diferentes razas, de modo que en la población asiática el polimorfismo CYP2C9*2 es muy poco frecuente, y CYP2C9*3 no se ha encontrado en esta población (47). En afroamericanos, la frecuencia alélica de CYP2C9*3 es de alrededor de 6% (48). Sin embargo, el 15-30% de las personas de raza blanca tienen alguna variante alélica, ya sea CYP2C9*2 ó CYP2C9*3, en este gen (49).

La variante alélica CYP2C9*8 (Arg150His, rs7900194) se manifiesta en el 10-12% de los individuos afroamericanos (50, 51). Esta variante alélica es responsable de una disminución de la actividad enzimática. Por lo tanto, los individuos portadores de esta variante alélica necesitan menor dosis de warfarina para alcanzar anticoagulación estable en comparación con los individuos de tipo wild-type (52, 53).

2.4.1.2. VKORC1

Los derivados cumarínicos ejercen su acción mediante la inhibición de la regeneración de la vitamina K reducida(24). Este efecto se realiza a través de la inhibición de la VKORC1 (54, 55). La VKORC1 codifica esta proteína y está situada en el brazo corto del cromosoma 16. Contiene 3 exones y 2 intrones, codificando una proteína de membrana de 163 residuos de aminoácidos (54). Varios polimorfismos en el gen VKORC1 se han asociado a la variabilidad en la dosis requerida de warfarina, principalmente localizados en la región no codificante (19). Se han asociado cuatro haplotipos en VKORC1 (*1, *2, *3, *4) a la variabilidad en la dosis requerida de warfarina en población caucásica (56). El haplotipo *1 corresponde a la ausencia de polimorfismo; haplotipo *2 VKORC1 corresponde a la variación alélica C1173T (rs9934438),

que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo G1639A (rs9923231) en sentido 5' y con el polimorfismo C2255T (rs2359612). El haplotipo VKORC1*3 corresponde al polimorfismo G9041A (rs7294), y el haplotipo VKORC1*4 corresponde a la variante alélica C6009T (rs17708472) (57, 58). El haplotipo VKORC1 *2 se asocia con sensibilidad en la dosis necesaria de derivados de cumarínicos, mientras que los haplotipos *3 y *4 están asociados con un mayor requerimiento de dosis de warfarina para lograr el mismo nivel de anticoagulación de los pacientes de tipo wild-type para este gen (40, 59-61).

El haplotipo VKORC1 *2 es el más frecuente entre la población de raza caucásica y asiática. Este haplotipo altera el sitio de unión del factor de transcripción, lo que conduce a la disminución de la expresión de la proteína (62). La frecuencia alélica del haplotipo VKORC1*2 en caucásicos es de 39.8% para los wild-type, el 40.7% para los heterocigotos mutados y 19.5% para homocigotos mutados (63). Se ha descrito que este polimorfismo de VKORC1 presenta una influencia de 11 a 30% de la variabilidad total de los derivados cumarínicos en poblaciones caucásicas y asiáticas (64-68). La influencia de este polimorfismo en la variabilidad de la dosis de warfarina en raza negra es de 4 a 10% (69-71).

2.4.2. Otros genes relacionados con la respuesta anticoagulante

2.4.2.1. CYP4F2

CYP4F2 es una Vitamina K oxidasa(72). Se ha descrito una variante alélica (rs2108622; V433M) en el gen CYP4F2 que posee influencia en la dosis requerida de los derivados cumarínicos (50, 73, 74). La variante alélica CYP4F2*3 es responsable de una actividad enzimática reducida, por lo que el polimorfismo V433M en CYP4F2 se ha asociado con un aumento de la dosis necesaria para alcanzar el rango terapéutico de INR (73). Aunque existe asociación entre la presencia del polimorfismo CYP4F2*3 y un aumento de la dosis requerida, la influencia del polimorfismo es de 1-2% en la variabilidad total del requerimiento de dosis (50). Algunos estudios han asociado el polimorfismo V433M en CYP4F2 con ictus isquémico e infarto de miocardio (75, 76).

2.4.2.2. CYP2C19

La actividad anticoagulante de acenocumarol recae principalmente sobre el enantiómero R-acenocumarol, el cual se metaboliza mayoritariamente a través de CYP2C9, pero también por otras isoenzimas del CYP450, como CYP1A2, y 20% a través de CYP2C19 (77, 78). Las diferencias en la actividad mediada por CYP2C19 en caucásicos viene determinado por el alelo inactivo CYP2C19*2 y el alelo relacionado con aumento de actividad CYP2C19*17 (38). Aunque no se ha demostrado influencia de polimorfismos en estas isoenzimas con la dosis requerida

para alcanzar la anticoagulación estable, la administración de fármacos concomitantes que se metabolizan por CYP450, como por ejemplo, inhibidores de la bomba de protones, que son metabolizados principalmente por CYP2C19, pueden incrementar el riesgo de sobreanticoagulación en pacientes que reciben anticoagulación oral de larga duración (78).

2.4.2.3. APOE

La filoquinona (vitamina K1) es la forma más común de la vitamina en la dieta y se encuentra en vegetales verdes y en aceites vegetales (79). En el plasma, la vitamina K1 se une a quilomicrones y a quilomicrones remanentes. La absorción de esta lipoproteína rica en vitamina K rica en el hígado y otros tejidos se realiza mediante la apolipoproteína E (ApoE), un constituyente de quilomicrón remanente, que se une a receptores lipoproteicos (80).

ApoE es una proteína polimórfica definida por tres alelos: E2, E3 y E4 (definidos por dos SNPs, rs429358 y rs7412), localizados en un solo locus en el cromosoma 19 (81). Se ha descrito que individuos con los genotipos E4/E4 y E3/E4 requirieron dosis más bajas de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable que los pacientes con el genotipo E3/E3 (rs429358). Los pacientes con el genotipo E2/E2 necesitaron una dosis mayores dosis de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable en comparación con los pacientes E3/E3 (82). Por otro lado, el alelo E4 para APOE se asoció a un mayor requerimiento de warfarina en afroamericanos pero no en caucásicos (83).

2.4.2.4. ABCB1

El transportador glicoproteína-P está codificado por el gen ABCB1 (adenosine triphosphate-binding cassette), que juega un papel importante en la variabilidad de la biodisponibilidad oral de muchos fármacos, en particular el polimorfismo del gen C3435T (rs1045642) (84, 85). La contribución del polimorfismo C3435T con el requerimiento de la dosis de los derivados cumarínicos se encuentra poco estudiada y se han obtenido resultados contradictorios (36, 86, 87). En el estudio llevado a cabo por Wadelius et al., los pacientes heterocigotos para el haplotipo ABCB1 D (que incluye la variante alélica C3435T) necesitaron dosis un 24% menor de warfarina en comparación con el resto para alcanzar el rango terapéutico de INR (36). Sin embargo, otros investigadores han descrito que el haplotipo ABCB1 2677GG/3435CC se encuentra asociado a dosis bajas de los derivados cumarínicos para alcanzar el rango terapéutico de INR (86, 87).

2.4.2.5. GGCX

El gen que codifica la gamma glutamil carboxilasa (GGCX) se ha estudiado como un gen candidato potencial que puede afectar en la respuesta farmacodinámica de warfarina. La enzima gamma-glutamyl carboxilasa cataliza la biosíntesis del factor de coagulación dependiente de la vitamina K (88). GGCX es un cofactor esencial en la reducción de la vitamina K epóxido 2-3 para el biológicamente activo vitamina K hidroquinona, responsable de la síntesis de factores de coagulación que activan la cascada de coagulación (88, 89). Un estudio sueco evaluó el efecto de un polimorfismo (rs12714145) en el gen GGCX, encontrando una pequeña pero significativa asociación de esta variante con el requerimiento de dosis de warfarina (61). Otra variante alélica (rs11676382) en el gen GGCX se ha asociado con una reducción en el requerimiento de dosis necesaria de warfarina para alcanzar INR terapéutico con una influencia en la variabilidad total de la dosis de aproximadamente 2% (90).

2.4.2.6. CALU

Calumenina, codificada por CALU, se une a GGCX e inhibe el sitio de unión de la vitamina K epóxido (91, 92). Una variante alélica (rs339097) en el gen CALU ha sido descrita como posible predictor de dosis de warfarina más altas de afroamericanos y en una población egipcia (92, 93).

2.4.3. Influencia de polimorfismos genéticos en la eficacia y seguridad

Las primeras investigaciones se centraron en la influencia de los polimorfismos genéticos presentes en CYP2C9 con la variabilidad de la respuesta anticoagulante. Un pequeño estudio realizado en Inglaterra comparó 36 pacientes analizó el efecto de CYP2C9*2/*3 en la dosis y en la incidencia de complicaciones hemorrágicas. En el grupo de dosis baja, el 89% de los pacientes incluidos presentaron al menos una variante alélica para CYP2C9. La incidencia de hemorragias graves fue mayor en el grupo de dosis baja en comparación con los controles aleatorios (OR: 3.7; IC_{95%} [1-10] p=0.007) (45).

Un estudio italiano fue uno de los primeros en manifestar que los pacientes que presentan alguna variante alélica en CYP2C9*2/*3 requieren dosis más bajas de warfarina para alcanzar rango de INR terapéutico y tenían una mayor tasa de complicaciones hemorrágicas que los pacientes wild-type para este gen (94). Se presentaron cincuenta y nueve episodios de sangrado (10 mayores y 49 eventos menores) en 36 pacientes, la incidencia de episodios hemorrágicos en pacientes con alguna variante alélica CYP2C9*2 y/o CYP2C9*3 fue 27.9% mientras que sólo el 12.8% de los pacientes wild-type presentaron algún evento hemorrágico (94).

A pesar de la evidencia de que algunos portadores del alelo *2 ó *3 en CYP2C9 han mostrado sensibilidad a warfarina y aumento del riesgo de sobreanticoagulación; este gen sólo ha sido capaz de explicar el 10% de la variabilidad total de la dosis de warfarina (95). Por esta razón, las siguientes investigaciones se centraron en la presencia de variantes alélicas en la diana terapéutica de los derivados cumarínicos (39, 54). La identificación de polimorfismos en VKORC1 condujo a los investigadores a estudiar la influencia de variantes alélicas en este gen con la variabilidad de dosis requerida de warfarina para alcanzar la anticoagulación estable, mostrando asociación entre la presencia de haplotipos de VKORC1 y los requerimientos de dosificación de warfarina (40, 61, 96).

En el estudio de Rieder et al. se identificaron 10 polimorfismos y dos haplotipos relacionados con la variabilidad en la dosis requerida de warfarina. Agruparon los haplotipos más comunes (H1, H2, H7, H8 y H9) formando dos grupos diferentes, asignando el haplotipo A (H1, H2) y el haplotipo B (H7, H8 y H9). El haplotipo A se asoció a sensibilidad en la dosis requerida de warfarina y el haplotipo B se asoció a resistencia en la dosis requerida de warfarina. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los haplotipos, relacionando el haplotipo A/A con la dosis baja, el haplotipo A/B con la dosis intermedia y el haplotipo B/B con la dosis alta. La dosis de mantenimiento de warfarina fue: 2.7 ± 0.2 mg/día para el grupo de dosis baja (A/A), 4.9 ± 0.2 mg/día en el grupo de dosis intermedia (A/B) y 6.2 ± 0.3 mg/día en el grupo de dosis alta (B/B) ($p < 0.001$) (40).

El siguiente paso fue evaluar la influencia de polimorfismos en CYP2C9 y VKORC1 con la dosis de warfarina necesaria para alcanzar estabilidad en una cohorte de 350 pacientes. Los pacientes con el genotipo homocigoto mutado para VKORC1 recibieron 22.5 mg/semana menos que los pacientes wild-type para este gen ($p < 0.001$). Asimismo, los pacientes portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 (*2/*3) necesitaron 9.5 mg/semana menos que los pacientes wild-type (*1/*1) para este gen ($p < 0.001$) (97).

La influencia de polimorfismos en los genes GGX y VKORC1 fue analizado en 201 pacientes (mayoría caucásicos), en terapia anticoagulante oral de larga duración (61). En este estudio definieron cinco polimorfismos comunes, cuatro de ellos se encontraban en desequilibrio de ligamiento (rs9923231, rs9934438, rs2359612 y rs7294) y un quinto polimorfismo (rs11150606) con una menor frecuencia alélica (aproximadamente de 4%). Estos polimorfismos explicaron aproximadamente el 30% de la variabilidad total en la dosis requerida de warfarina. El polimorfismo genético GGX (rs12714145) mostró una pequeña pero significativa asociación con la dosis de warfarina (61).

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

Las variantes alélicas presentes en los genes CYP2C9 y VKORC1, sumado a los factores clínicos, pueden explicar aproximadamente el 54% de la variabilidad total de la dosis necesaria de los derivados cumarínicos. En la búsqueda de otras variantes alélicas capaces de aumentar el porcentaje de variabilidad explicado, se identificó un nuevo polimorfismo (rs2108622) en el gen CYP4F2 en una pequeña muestra de pacientes que incrementó el porcentaje de variabilidad explicado hasta el 56% de la dosis requerida de warfarina (73). Los portadores del genotipo CC (wild-type) requirieron dosis más bajas que los pacientes con genotipo CT o TT para este gen. Esta variante alélica se asoció, por tanto, a resistencia a derivados de cumarínicos.

El principal objetivo del inicio de la terapia anticoagulante oral con derivados cumarínicos es minimizar el tiempo necesario para alcanzar el rango terapéutico INR e intentar mantener al paciente el mayor tiempo posible dentro del rango terapéutico. Los estudios farmacogenéticos posteriores se focalizaron en estos objetivos a través de la determinación del perfil genético de los pacientes en tratamiento anticoagulante de larga duración. Schwarz et al. analizaron la influencia de polimorfismos en CYP2C9 y VKORC1 con el tiempo necesario hasta alcanzar el rango de INR terapéutico y con el riesgo de sobreanticoagulación (INR>4) en pacientes caucásicos que iniciaron tratamiento con warfarina (27). Los pacientes con el haplotipo A/A para el gen VKORC1 alcanzaron antes el rango de INR terapéutico y presentaron antes algún INR>4 comparado con el resto de los pacientes. Las variantes alélicas en CYP2C9 no presentaron influencia en el alcance del rango de INR terapéutico. Sin embargo, los pacientes portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 (*2 ó *3) presentaron algún INR> 4 antes de que los pacientes wild-type para este gen.

La influencia de estos polimorfismos genéticos también se ha evaluado en otras poblaciones diferentes de la raza caucásica. Limdi et al. analizaron la influencia de los polimorfismos genéticos en CYP2C9/VKORC1 con el tiempo hasta alcanzar el rango de INR terapéutico y con el riesgo de sobreanticoagulación (INR>4) en una cohorte de 521 pacientes que incluyó afroamericanos y estadounidenses de origen europeo (48). Además de CYP2C9*2/*3, los afroamericanos presentaron otras variantes alélicas (CYP2C9*5/*6/*11), mientras que las variantes alélicas encontradas en pacientes estadounidenses de origen europeo fueron CYP2C9*2/*3. Además, el polimorfismo G1639A en VKORC1 (rs9923231) presentó una frecuencia alélica mayor en la población europea comparado con la población afroamericana (60.4% vs 20.1; $p < 0.001$). Los portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 y VKORC1 alcanzaron antes el rango de INR terapéutico que los pacientes wild-type para estos genes. Por otro lado, el polimorfismo en VKORC1 fue más decisivo que CYP2C9 en el alcance

del rango de INR terapéutico. Los pacientes portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 y/o VKORC1 mostraron más incidencia de INR>4 comparado con pacientes wild-type ($p < 0.0001$). Los pacientes afroamericanos presentaron menos INR>4 (60 episodios en 46 pacientes) que los pacientes europeos americanos (98 episodios en 78 pacientes) ($p = 0.017$). Ambos polimorfismos genéticos presentaron influencia en la sensibilidad a warfarina (48). Según estos resultados, la determinación de polimorfismos genéticos (CYP2C9 y VKORC1) antes del comienzo de la terapia de anticoagulación oral con los derivados cumarínicos puede mejorar la predicción de la dosis inicial, comparado con la predicción de la dosis basada solamente en parámetros clínicos. La pregunta siguiente es si los polimorfismos genéticos mantienen su influencia después del primer mes (periodo de mayor riesgo de eventos adversos). Un estudio reciente evaluó la influencia de VKORC1/CYP2C9*2/*3 durante los tres primeros meses de tratamiento anticoagulante en 557 pacientes con el objetivo de analizar la presentación de algún INR> 5, la tasa de hemorragias, el tiempo necesario para alcanza el rango de INR terapéutico, el requerimiento de dosis para alcanzar estabilidad y el tiempo necesario para alcanzar estabilidad anticoagulante (98). Los pacientes con genotipo AA para VKORC1 presentaron más INR> 5 que el resto durante el primer mes ($p < 0.001$). Después de los tres meses se perdió esta asociación. Como era de esperar, los pacientes portadores de genotipo AA para VKORC1 presentaron más hemorragias comparados con pacientes wild-type (4.9% vs 0.47%; $p < 0.009$). El gen CYP2C9 no mostró ninguna influencia con la presentación de INR>5 ni con eventos hemorrágicos. Por otro lado, VKORC1 y CYP2C9*2 fueron relevantes en la variabilidad del requerimiento de la dosis estables requeridas. De acuerdo con estos resultados, la determinación del perfil genético en CYP2C9 y VKORC1 antes de iniciar mejora la farmacoterapia. Sin embargo, a partir del primer mes la influencia en la respuesta anticoagulante se pierde.

Por lo tanto, los polimorfismos genéticos en CYP2C9 y VKORC1 son responsables de aproximadamente el 40% de la variabilidad en la dosificación de los derivados cumarínicos (78, 99-102). Sumado a los factores ambientales, éstos pueden explicar aproximadamente el 50% de la variabilidad total en la dosis requerida de los derivados cumarínicos (28-32, 71, 96). Los individuos portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 (rs105791, rs1799853) y VKORC1 (rs9923231), solas o en combinación, están relacionados con un mayor riesgo de sobreanticoagulación (INR>4), alcance tardío de la estabilidad anticoagulante y menos dosis para alcanzar estabilidad anticoagulante en comparación con los pacientes wild-type (19, 103-105). Se ha descrito que la influencia CYP2C9 sobre la respuesta al tratamiento anticoagulante

con acenocumarol es menos relevante en comparación con el tratamiento con warfarina (43, 106).

Numerosos estudios han demostrado la influencia de CYP2C9 y VKORC1 en la respuesta (eficacia y seguridad) al tratamiento con warfarina durante los primeros meses de tratamiento (27, 39, 48, 98, 105, 107-110). Menor número de estudios han analizado la influencia de estos polimorfismos en la respuesta anticoagulante al comienzo del tratamiento con acenocumarol (19, 104, 111-113). La variabilidad interindividual de la respuesta inicial en el tratamiento de los antagonistas de la vitamina K se encuentra ampliamente relacionada con CYP2C9 y VKORC1. Sin embargo, variantes alélicas en otros genes, tales como CYP4F2, ABCB1, APOE, CYP2C19, pueden ser de interés en el conocimiento de la variabilidad de la respuesta en términos de seguridad y eficacia.

2.4.4. Aplicación de la determinación genética. Desarrollo algoritmos de dosificación

Como se ha comentado anteriormente, los factores clínicos, sociodemográficos y genéticos explican aproximadamente el 50% de la variabilidad total de la dosis de los derivados cumarínicos (28-32, 71, 96).

Recientemente, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado nuevos anticoagulantes orales (dabigatrán, rivaroxabán y apixabán) para la prevención y el tratamiento de episodios tromboembólicos asociados con la fibrilación auricular no valvular (114-116). Estos nuevos anticoagulantes presentan un inicio de acción más rápido en comparación con los antagonistas de la vitamina K, respuesta predecible y pocas interacciones farmacológicas, lo que permite la administración en dosis fijas sin necesidad monitorización constante (117-119). A pesar de estas numerosas ventajas, warfarina y acenocumarol permanecen como la anticoagulantes orales más prescritos para estas indicaciones en muchos países (120-122). Una de las causas más probables que limitan el uso de nuevos anticoagulantes orales es el alto coste que presentan en comparación con los anticoagulantes orales clásicos. Además, los antagonistas de la vitamina K han demostrado ser tan seguros y eficaces como los nuevos anticoagulantes orales cuando los pacientes son capaces de mantener el tiempo dentro del rango terapéutico de INR al menos el 66% del tiempo (117-119, 123).

Para los antagonistas de la vitamina K, el primer mes de tratamiento es el más problemático, ya que constituye el periodo en que se desconoce la dosis para mantener terapéutico INR y se requieren numerosos ajustes de la dosis de manera empírica (27). Por lo tanto, en los primeros meses de tratamiento con antagonistas de la vitamina K, los pacientes se encuentran en mayor riesgo de presentar hemorragias y eventos tromboembólicos (124-126). El riesgo de

hemorragia y de eventos tromboembólicos se reduce cuando los pacientes mantienen el mayor tiempo posible el INR dentro del rango terapéutico (127, 128). Por lo tanto, el objetivo clínico actual es alcanzar el rango de INR terapéutico y mantenerlo el mayor tiempo posible.

Ante la evidencia de la influencia de CYP2C9 y VKORC1 en la variabilidad de la dosis de warfarina, la FDA emitió una recomendación favorable para el uso de estos biomarcadores en la determinación del ajuste de la dosis inicial de warfarina (129). Posteriormente elaboraron una tabla de recomendación de dosis inicial de warfarina que incluía la determinación genética de CYP2C9 y VKORC1 (130). A raíz del posicionamiento favorable de la FDA en la determinación de perfiles genéticos en la predicción de la dosis estable de warfarina, se han propuesto varios algoritmos que incluyen variables clínicas, demográficas y genéticas (CYP2C9 y VKORC1) como factores predictivos de la dosis necesaria de derivados cumarínicos, muchos más focalizados en warfarina (28, 31, 66, 95, 131-136) comparado con acenocumarol (33-35, 137-139).

2.4.4.1. Algoritmos farmacogenéticos online que predicen dosis de warfarina

Dos de los algoritmos farmacogenéticos validados que predicen la dosis necesaria de warfarina para alcanzar la estabilidad anticoagulante se encuentran disponibles en internet (28, 95). En el estudio de Gage et al. reclutaron una amplia cohorte de 1015 pacientes para la elaboración de este algoritmo. Los polimorfismos genéticos en VKORC1 y CYP2C9 fueron los factores predictivos más importantes en la predicción de la dosis inicial de warfarina. El algoritmo farmacogenético fue capaz de explicar hasta un 54% de la variabilidad total en la dosis estable de warfarina (95). El algoritmo desarrollado por el grupo de investigación IWPC (International Warfarin Pharmacogenetic Consortium) fue validado en 5.000 pacientes que se encontraban en tratamiento con warfarina debiendo mantener el rango terapéutico de INR entre 2-3. Clasificaron los pacientes en función de la dosis requerida, definiéndolos en grupo de dosis baja (≤ 21 mg/semana), intermedia (21-49 mg/semana) y dosis alta (≥ 49 mg/semana). El algoritmo mostró una mejor predicción de la dosis de warfarina en los grupos de dosis baja y alta. Ambos grupos representaban el 46% de la cohorte total. Este algoritmo resultó más útil en la predicción de la dosis estable de warfarina en pacientes que están en uno de estos grupos (28). Ambos algoritmos están disponibles en internet de manera gratuita y aplicación sencilla; sólo es necesario introducir las variables clínicas y genéticas para calcular la dosis estable de warfarina. El algoritmo desarrollado por Gage et al. está disponible en el sitio web www.warfarindosing.org y el algoritmo desarrollado por el grupo IWPC se encuentra en el sitio web www.pharmgkb.org/page/iwpc.

2.4.4.2. Algoritmos farmacogenéticos que predicen la dosis de acenocumarol

Se han desarrollado siete algoritmos farmacogenéticos capaces de predecir la dosis estable de acenocumarol (33-35, 137-139) y sólo uno ha sido validado externamente (138). La mayoría de estos se han desarrollado en población Caucásica, excepto el desarrollado en población india (35). Las principales indicaciones de estos algoritmos fueron fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa y pacientes portadores de válvulas cardíacas. Estos modelos incluyen variables clínicas y los polimorfismos genéticos VKORC1/CYP2C9 (33-35, 137-139). Algunos autores también han descrito la influencia adicional de otros polimorfismos genéticos: CYP4F2*3 (rs2108622) (33, 34), APOE (rs7412) (33), y GGCX (rs11676382) (35) con la dosis estable de acenocumarol. El porcentaje de la variabilidad explicado por los diferentes algoritmos farmacogenéticos oscila entre el 41.4% y el 60.6% de la variabilidad total de la dosis necesaria para alcanzar la anticoagulación estable, dejando un porcentaje sustancial de variabilidad en la dosis total sin explicar.

2.4.5. Validación externa de los algoritmos farmacogenéticos

Una vez elaborado el algoritmo farmacogenético capaz de predecir la dosis estable de derivados cumarínicos, es necesario validarlo en una cohorte externa para elucidar la validez y utilidad potencial de ese modelo en la práctica clínica o si por el contrario es necesario elaborar un algoritmo capaz de predecir la dosis estable en una población específica. La extrapolación externa de algoritmos farmacogenéticos ha sido más estudiada en aquéllos que predicen la dosis estable de warfarina en comparación con acenocumarol (71, 134, 140-144), siendo capaces de explicar aproximadamente 36-65% de la variabilidad total en el requerimiento de dosis de warfarina en una cohorte diferente de la que se ha desarrollado el algoritmo originalmente. El único algoritmo farmacogenético validado que predice la dosis de acenocumarol es el desarrollado por el grupo de investigación EU-PACT (European pharmacogenetics of anticoagulant therapy). Para el desarrollo del algoritmo reclutaron alrededor de 1000 pacientes tratados con acenocumarol y fenprocumón que presentaban fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa, reemplazo de válvula cardíaca y otras condiciones en los Países Bajos. El algoritmo farmacogenético fue capaz de explicar hasta el 52.6% de la variabilidad total en la dosis en la cohorte original (138). Posteriormente, validaron externamente este algoritmo en una cohorte independiente de pacientes obteniendo resultados similares (52.7%) a los alcanzado en la cohorte original (145).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La determinación de los perfiles genéticos es de utilidad en la mejora de la farmacoterapia de pacientes diagnosticados de fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa y pacientes portadores de prótesis valvulares cardíacas que inician tratamiento de larga duración con acenocumarol, aumentando la seguridad y optimizando la predicción de la dosis necesaria para alcanzar la anticoagulación estable.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la seguridad y eficacia de la farmacoterapia de la anticoagulación oral en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa y pacientes portadores de prótesis valvulares cardíacas que inician tratamiento de larga duración con acenocumarol mediante la identificación de polimorfismos genéticos capaces de predecir el riesgo de efectos adversos y la dosis necesaria para alcanzar la anticoagulación estable.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos: CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), VKORC1 (rs9923231), CYP4F2*3 (rs2108622), ABCB1 C3435T (rs1045642), APOE (rs429358 y rs7412), CYP2C19*2 (rs4244285) y CYP2C19*17 (rs12248560) en la seguridad del tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol en pacientes diagnosticados de FA y ETEV durante los primeros 7 meses de tratamiento, definida como el tiempo dentro/fuera de rango terapéutico de INR, alcance de la estabilidad anticoagulante, tiempo necesario hasta alcanzar la estabilidad, sobreanticoagulación (INR>4) y eventos hemorrágicos producidos.
- II. Desarrollar un algoritmo de dosificación individualizada de acenocumarol que incluya las variables clínicas y genéticas (CYP2C9 (rs1799853 y rs1057910), VKORC1 (rs9923231), CYP4F2*3 (rs2108622), ABCB1 C3435T (rs1045642), APOE (rs429358 y rs7412), CYP2C19 (rs4244285 y rs12248560) y GGX (rs12714145 y rs11676382)) que presenten influencia en la variabilidad interindividual de la dosis necesaria para alcanzar anticoagulación estable en pacientes diagnosticados de FA y ETEV.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

Para responder a los objetivos de la investigación planteados, el Plan de Trabajo se diseñó en dos partes consecutivas, que se describen a continuación.

La **primera parte** de este trabajo de investigación se ha focalizado en la identificación de variables clínicas y genéticas (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2*3, ABCB1, APOE, CYP2C19) que presenten influencia en la seguridad del tratamiento de anticoagulación oral en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa durante los primeros 7 meses de terapia.

En la **segunda parte** de este trabajo de investigación, se analizó la influencia de las variables clínicas y genéticas (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2*3, ABCB1, APOE, CYP2C19, GGX) con la dosis estable de acenocumarol en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa con el objetivo de optimizar la predicción de la dosis mediante un algoritmo que incluyese las variables clínicas y genéticas que presentasen asociación con el requerimiento de dosis estable (eficacia).

4.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL

4.1.1. Diseño

Estudio observacional retrospectivo.

4.1.2. Población diana

Pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa que inicien tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol.

4.1.3. Ámbito de estudio

El estudio se realizó en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa que iniciaron tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol en el Servicio de Hematología del Complejo Hospitalario de Granada y permanecieron tratados durante un periodo mínimo de siete meses, desde Marzo de 2010 hasta Junio de 2013.

4.1.4. Criterios de inclusión

Pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa que inicien tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol y permanezcan tratados durante un periodo mínimo de siete meses.

4.1.5. Criterios de exclusión

Pacientes que presentasen insuficiencia renal crónica o mujeres embarazadas. Negativa a participar en el estudio o cumplimentar la hoja de Consentimiento Informado.

4.1.6. Fuentes de información

La fuente primaria de información fue la Historia Clínica del paciente, recogida mediante las bases de datos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Estación Clínica, Diraya Clínica, TaoNet) así como la información obtenida en la entrevista de invitación de participación en el estudio.

4.1.7. Variables

4.1.7.1. Variables independientes (Clínicas, sociodemográficas y genéticas)

Variables clínicas y sociodemográficas:

Edad, sexo (hombre/mujer), índice de masa corporal (kg/m^2), indicación para anticoagulación oral (fibrilación auricular/enfermedad tromboembólica venosa), administración concomitante de inhibidores de CYP2C9 (omeprazol / estatinas), hábito tabáquico (sí/no) e ingesta de alcohol (sí/no).

Variables genéticas:

CYP2C9*3 (rs1057910), CYP2C9*2 (rs1799853), VKORC1 (rs9923231), CYP4F2 (rs2108622), ABCB1 C3435T (rs1045642), APOE (rs429358, rs7412), CYP2C19*2 (rs4244285) y CYP2C19*17 (rs12248560).

4.1.7.2. Variables dependientes (Seguridad)

La variable dependiente (seguridad) fue definida en función de los siguientes parámetros:

- **Porcentaje de tiempo dentro/fuera de rango terapéutico de INR.** Se ha considerado el rango terapéutico de INR entre 2-3; por encima del rango terapéutico cuando fue superior a 3 y rango por debajo del rango terapéutico cuando fue inferior a 2 (1). El tiempo dentro/encima/debajo de rango se calculó utilizando el método de Rosendaal (133), que realiza una interpolación lineal de los valores de INR para calcular el porcentaje de días en que el INR está dentro del rango terapéutico.
- **Alcance de la estabilidad anticoagulante.** La dosis se consideró estable cuando se mantuvo con una variación inferior al 10% durante tres pruebas consecutivas de INR.
- **Tiempo necesario hasta alcanzar la estabilidad anticoagulante.**
- **Sobreaticoagulación (INR>4).** La sobreaticoagulación se definió como la presentación de al menos un valor de INR>4.

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

- **Sobreanticoagulación severa (INR>6).** La severa sobreanticoagulación se definió como la presentación de al menos un valor de INR>6.
- **Reacciones adversas.** Se considera reacciones adversas las hemorragias y/o trombos derivados del uso de acenocumarol. Las hemorragias mayores se definieron como una reducción en el nivel de hemoglobina ≥ 20 g/l, necesidad de transfusión de 2 ó más unidades de sangre o cualquier hemorragia sintomática en un área o un órgano crítico; mientras que hemorragias no mayores como el resto de las hemorragias ocurridas (103).

Para el análisis, el periodo de siete meses se dividió en tres etapas:

- 0-1 mes de tratamiento anticoagulante con acenocumarol. Para el periodo 0-1 mes sólo se consideraron los pacientes con un mínimo de 4 determinaciones de INR.
- 0-7 meses de tratamiento anticoagulante con acenocumarol.
- 1-7 meses de tratamiento anticoagulante con acenocumarol.

4.1.8. Metodología para la determinación perfiles farmacogenéticos

La determinación de los polimorfismos genéticos incluidos en el estudio se ha llevado a cabo mediante la siguiente metodología:

4.1.8.1. Extracción de ADN

Las muestras de sangre de los pacientes fueron recogidas mediante tubos BD Vacutainer®K3E Plus Blood Collection (3 ml), y las muestras de saliva fueron recolectados en tubos cónicos de 50 ml BD Falcon™ (BD, Plymouth, Reino Unido). La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción QIAamp DNA Mini (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo las especificaciones concretas para cada tipo de muestra, proporcionadas por el fabricante. La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en un gel al 1% de agarosa. La concentración y la pureza del ADN se midieron con el espectrofotómetro de UV NanoDrop 2000 mediante la relación de absorbancia a 280/260 y 280/230.

4.1.8.2. PCR convencional

La amplificación de los genes VKORC1, CYP2C9, CYP4F2, APOE y GGCX- rs12714145 se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional en el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) en un volumen final de 25 μ l, utilizando una mezcla que contenía aproximadamente 50 ng de ADN. Los productos amplificados de PCR fueron chequeados en geles de agarosa al 2%

con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software 170-8195 (Bio-Rad® Life Science, Hercules, CA, USA).

La mezcla de reacción de PCR para los polimorfismos genéticos CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2*3 y APOE contenía 8 pmol de cada cebador o “primer”, 50 nmol de MgCl₂, 2 nmol de dNTPs (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), 0,75 U AmpliTaq Gold® DNA polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y 4% de dimetilsulfóxido (DMSO) (8% para APOE) en 1× PCR Gold Buffer.

El programa de amplificación para el CYP2C9*2, CYP2C9*3, de VKORC1, CYP4F2*3 se llevó a cabo utilizando un programa de PCR touchdown, con una etapa de desnaturalización inicial de 15 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 65-55°C (la temperatura de hibridación se redujo en 0.5°C por cada ciclo), 30 segundos a 72 °C y una etapa de elongación final de 7 min a 72°C.

El programa de amplificación para APOE se inició con una etapa de desnaturalización inicial de 15 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C y una etapa de elongación final de 7 min a 72°C.

4.1.8.3. PCR-RFLP

Para la determinación de los polimorfismos genéticos VKORC1 (rs9923231), CYP2C9*2 (rs1799853) y CYP4F2*3 (rs2108622) se utilizó la técnica de PCR seguida de un análisis de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) con las enzimas de restricción HpaII para VKORC1, AvcII para CYP2C9*2 y PvuII para CYP4F2*3. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante toda la noche, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (New England Biolabs Inc®, Massachusetts, EE.UU.). Los fragmentos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 3-4% con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los resultados de la PCR-RFLP fueron confirmados por secuenciación directa en un 10% de las muestras.

4.1.8.4. Secuenciación directa

Para la determinación de los polimorfismos genéticos CYP2C9*3 (rs1057910) y APOE (rs429358 y rs7412) se utilizó la técnica PCR seguida de secuenciación directa.

Los productos de la PCR fueron purificados utilizando el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). La reacción de secuenciación se realizó utilizando 1 µl de reactivo Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 0,5 µl de producto de PCR purificado y 2 pmol del primer forward de PCR. Los productos de secuenciación fueron purificados para retirar el exceso de nucleótidos marcados utilizando el DyeEx 2.0 Spin Protocol (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

A continuación, las muestras se secaron en una centrifuga de vacío durante 20 minutos. La lectura de la secuenciación se realizó en un secuenciador de ADN ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

4.1.8.5. PCR Real Time

La determinación de los polimorfismos genéticos ABCB1 C3435T (rs1045642), CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560) y GGX-rs11676382 fue realizada mediante PCR a tiempo real a través de diagramas de discriminación alélica utilizando sondas TaqMan®PCR en el instrumento Applied Biosystems StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillado/extensión a 60°C durante 60 segundos. La intensidad de la señal de fluorescencia debido a la degradación de la sonda TaqMan® se cuantificó durante la fase de anillado de cada ciclo de PCR. El análisis genotípico de las muestras de ADN se realizó por duplicado. La presencia de genotipo wild-type y las variantes alélicas se definieron comparando de el punto final de fluorescencia relativa creado por la degradación de cada sonda marcada fluorescentemente con TaqMan® (FAM/VIC).

La tabla 1 resume la metodología utilizada para obtener los perfiles farmacogenéticos.

Tabla 1. Polimorfismos genéticos analizados y metodología empleada.

Polimorfismo	Primers (F/R)	Técnica	Enzima	Patrón de Fragmentos (pb)
CYP2C9*2 rs1799853	F: 5'- CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG-3' R: 5'- GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC -3'	PCR-RFLP	Avall	CC: 299+76 CT:299+76+375 TT:375
CYP2C9*3 rs1057910	F: 5'-AGGAAGAGATTGAACGTGTGA-3' R: 5'-GATACTATGAATTTGGGGACTTCTGA-3'	Seq	-	-
VKORC1 rs9923231	F: 5'-GGCCAGGCTTGTCTTAAACTCC-3' R: 5'- TTCCAGGGATTTCATGCAGGGAC-3'	PCR-RFLP	HpaII	CC: 90+225 CT: 90+225+315 TT: 315
CYP4F2*3 rs2108622	F:5'- GGAACTTGGACCATCTACA-3' R: 5'-CCTTCTCTCCACAGGCATTA-3'	PCR-RFLP	PvuII	CC:378+60 CT:378+60+438 TT:438
ABCB1 rs1045642	TGTTGGCCTCCTTTGCTGCCTCAC [A/G] ATCTCTCCTGTGACACCACCCGGC	TaqMan	-	-
APOE rs429358	F: TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' R: 5'-ACAGAATTCGCCCGGCTGGTACTACTGCC-3'	Seq	-	-
APOE rs7412	F: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' R:5'-ACAGAATTCGCCCGGCTGGTACTACTGCC-3'	Seq	-	-
CYP2C19*2 rs4244285	TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC [A/G] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA	TaqMan	-	-
CYP2C19*17 rs12248560	AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAG [C/T] ATCTCTGATGTAAGAGATAATGCGC	TaqMan	-	-
GGCX rs12714145	F: 5'- GCAAAACTCCCTCCAGTTGA-3' R: 5'- CCACCGTACCCAGCTAGAAA -3'	Seq	-	-
GGCX rs11676382	CTCTCCCCAGGGGAAAGTTACCAAG [C/G] TTGCCAACATATGATGGCAATGACA	TaqMan	-	-
Abreviaturas:	<p>CYP2C9*2: Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 9.Variante alélica 2. CYP2C9*3: Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 9.Variante alélica 3. CYP2C19*2: Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 19. Variante alélica 2. CYP2C19*17: Familia 2 del citocromo P-450. Subfamilia C. Polipéptido 19. Variante alélica 17 CYP4F2: Familia 4 del citocromo P-450. Subfamilia F. Polipéptido 2. GGCX: Gamma-Glutamil-Carboxilasa. ABCB1: Gen que codifica la glicoproteína-P. VKORC1: Vitamina K epóxido reductasa complejo 1. APOE: Apolipoproteína E. rs: Polimorfismo de referencia. F: Primer Forward. R: Primer Reverse. PCR:Reacción en cadena de la polimerasa. RFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción. Seq: Secuenciación Directa. TaqMan: PCR a tiempo real utilizando sondas TaqMan®PCR. Enzima: Enzima de restricción. Pb: Pares de bases.</p>			

4.1.9. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar para las variables con distribución normal, y como medianas y percentiles (25 y 75) para las variables de distribución no normal. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se aplicó el test de la t de Student o de ANOVA para las variables con distribución normal, y en caso de las variables no paramétricas, se aplicó el test de Mann-Whitney. La asociación bivalente para las variables dicotómicas cualitativas se analizó mediante el test de chi cuadrado de Pearson. La prueba de ANOVA o de Kruskal-Wallis se aplicó en el caso de las variables cualitativas con más de dos categorías. En función de la normalidad de los datos, para comparar las variables cuantitativas se utilizó la correlación de Pearson o Spearman. La corrección mediante el test de Bonferroni se aplicó en el caso de comparaciones múltiples para las variables de distribución normal; las variables no paramétricas fueron corregidas manualmente teniendo en cuenta el número de grados de libertad en cada variable. Se realizó un análisis multivariante (regresión logística o lineal) para detectar las posibles variables de confusión. En caso de no cumplimiento de la normalidad de los residuos de la regresión lineal, la variable respuesta se transformó utilizando la raíz cuadrada. La normalidad de los residuos en el modelo de regresión lineal fue testada usando la prueba de Shapiro-Wilks, y también se comprobó gráficamente (gráficos QQ). La homocedasticidad de los residuos fue comprobada usando la prueba de Breusch-Pagan.

Se realizó un análisis de supervivencia para analizar el tiempo necesario hasta alcanzar la estabilidad anticoagulante, el tiempo necesario para presentar algún INR>4, el tiempo necesario para presentar algún INR>6 y el tiempo necesario para presentar hemorragias mediante el método de Kaplan-Meier.

Se consideró un nivel de significación significativa de $p < 0.05$ para todas las pruebas.

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS 19.0 para Windows y R commander versión 2.13.

4.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL

4.2.1. Diseño

Estudio observacional retrospectivo.

4.2.2. Población diana

Pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa que inicien tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol.

4.2.3. Ámbito de estudio

El estudio se realizó en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa en tratamiento de anticoagulación oral con dosis estable de acenocumarol en el Servicio de Hematología del Complejo Hospitalario de Granada desde Marzo de 2013 hasta Junio de 2013.

4.2.4. Criterios de inclusión

Pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y/o enfermedad tromboembólica venosa que se encuentren en tratamiento de anticoagulación oral con dosis estable de acenocumarol.

4.2.5. Criterios de exclusión

Pacientes que presentasen insuficiencia renal crónica o mujeres embarazadas. Negativa a participar en el estudio o a cumplimentar y firmar la hoja de consentimiento informado.

4.2.6. Fuentes de información

La fuente primaria de información fue la Historia Clínica del paciente, recogida mediante las bases de datos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Estación Clínica, Diraya Clínica, TaoNet), así como la información obtenida en la entrevista de invitación al paciente de participación en el estudio.

4.2.7. Variables

4.2.7.1. Variables independientes (Clínicas, sociodemográficas y genéticas)

Variables clínicas y sociodemográficas:

Edad, sexo (hombre/mujer), índice de masa corporal (kg/m^2), indicación para anticoagulación oral (fibrilación auricular/enfermedad tromboembólica venosa), administración concomitante de inhibidores enzimáticos (omeprazol/estatinas/amiodarona) e inductores enzimáticos (fenitoina/carbamazepina/rifampicina) de CYP2C9, hábito tabáquico (sí/no) e ingesta de alcohol (sí/no).

Variables genéticas:

CYP2C9*2 (rs1799853), VKORC1 (rs9923231), CYP4F2 (rs2108622), CYP2C9*3 (rs1057910), APOE (rs429358, rs7412), GGCX (rs12714145), ABCB1 C3435T (rs1045642), CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560) y GGCX (rs11676382).

4.2.7.2. Variable dependiente (Dosis estable)

La dosis se consideró estable cuando se mantuvo con una variación inferior al 10% durante tres pruebas de INR consecutivas dentro del rango terapéutico.

4.2.8. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar para las variables con distribución normal, y como medianas y percentiles (25 y 75) para las variables de distribución no normal. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó el test de la t de Student o de ANOVA para las variables con distribución normal, y en caso de las variables no paramétricas se aplicó el test de Mann-Whitney. Las frecuencias genotípicas de la cohorte de derivación con la cohorte de validación se compararon mediante el test de chi cuadrado de Pearson. Para analizar la influencia en el requerimiento de dosis estable de las variables cualitativas con más de dos categorías se aplicó el test de ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis. En función de la normalidad de los datos, para comparar las variables cuantitativas se utilizó la correlación de Pearson o Spearman.

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado mediante la calculadora de equilibrio de Hardy-Weinberg, proporcionada por la enciclopedia online para los estudios de epidemiología genética (146).

4.2.9. Construcción de los algoritmos

La cohorte total fue aleatorizada en dos grupos:

- Cohorte de derivación, compuesta por aproximadamente el 80% de los pacientes incluidos en el estudio
- Cohorte de validación, compuesta por el 20% restante.

Los algoritmos (clínico y farmacogenético) se obtuvieron mediante análisis multivariante (regresión lineal múltiple), con el objetivo de identificar variables confusoras y determinar la influencia independiente de cada variable con la dosis estable de acenocumarol. Se construyeron usando los datos de la cohorte de derivación. Para la construcción de cada modelo (clínico y farmacogenético) se incluyeron en la regresión lineal múltiple aquellas variables con un nivel de significación $p \leq 0.05$ en el análisis bivariante o las que presentasen especial significado biológico. Una vez obtenidos ambos algoritmos (clínico y farmacogenético), estos modelos fueron probados en la cohorte de validación con el fin de establecer la exactitud de los mismos para predecir la dosis estable de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas incluidas en cada modelo.

4.2.10. Exactitud predictiva y relevancia clínica de los algoritmos

La variabilidad total explicada por el algoritmo farmacogenético y por el algoritmo clínico se evaluó de acuerdo con el coeficiente de determinación (R^2), procedente del análisis de regresión lineal múltiple.

Las desviaciones en la predicción de la dosis estable se analizaron calculando el error medio (ME), definido como la media de las diferencias entre la dosis predicha y la dosis observada de acenocumarol. La precisión predictiva de ambos modelos se evaluó mediante el cálculo del error absoluto medio (MAE), definido como la raíz cuadrada de ME^2 . Estos valores se expresaron también como porcentajes (%ME y %MAE). En función de la normalidad de las variables, las comparaciones de la ME y la MAE entre el algoritmo clínico y genético se realizó mediante la prueba t de Student o el test de Wilcoxon.

La relevancia clínica de los algoritmos se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de pacientes cuya predicción en la dosis de acenocumarol se desviaba menos del 10-15-20% de la dosis estable real. La sobreestimación y la subestimación se calcularon como el porcentaje de pacientes para los que los algoritmos predecían una dosis $>15\%$ por encima y una dosis $>15\%$ por debajo de la dosis real, respectivamente.

El beneficio potencial del algoritmo farmacogenético se comparó mediante el cálculo del número necesario para genotipar (NNG), que se define como el número de pacientes que deben ser genotipados para que un paciente tenga una estimación de la dosis con una desviación menor del 10-15-20% de la dosis estable real. (28).

Se consideró un nivel de significación significativa de $p < 0.05$ para todas las pruebas.

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS 19.0 para Windows.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL

5.1.1. Características clínicas de los pacientes

Las características clínicas de los 128 pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 2. La indicación más común para la anticoagulación oral fue fibrilación auricular (83,6%; 107/128). Omeprazol fue el fármaco más prescrito de manera concomitante (44.5%; 57/128), seguido de la administración concomitante de estatinas (38.1%; 48/126).

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes anticoagulados con acenocumarol

		N (%)
Edad (años)	73±9	
	≤65	27/128 (21.1)
	65-70	41/128 (32.0)
	70-85	50/128 (39.1)
	≥85	10/128 (7.8)
Género	Femenino	58/128 (45.3)
	Masculino	70/128 (54.7)
Indicación	Fibrilación auricular	107/128 (83.6)
	Enfermedad tromboembólica venosa	21/128 (17.4)
Índice de masa corporal (Kg/m²)	30±5	
	18.5-25	14/117 (12.0)
	25-30	50/117(42.7)
	≥30	53/117 (45.3)
Omeprazol	No	71/128 (55.5)
	Sí	57/128(44.5)
Estatinas	No	78/126 (61.9)
	Si	48/126 (38.1)
Hábito tabáquico	No	72/105 (68.6)
	Sí	5/105 (4.8)
	Ex	28/105 (26.7)
Consumo de alcohol	No	64/105 (61.0)
	Sí	38/105 (36.2)
	Ex	3/105 (2.9)
Las variables cuantitativas se expresan como : media ± desviación estándar		

5.1.2. Tiempo dentro/encima/ debajo del rango terapéutico de INR y alcance de la estabilidad anticoagulante

El tiempo dentro de rango terapéutico de INR se incrementó a lo largo del periodo de estudio, desde 33±26% en el primer mes de tratamiento hasta 61±19% en los últimos seis meses (Tabla 3). El tiempo por encima del rango terapéutico y tiempo por debajo del rango terapéutico se asociaron a mayor/menor edad, respectivamente, durante todo el periodo de estudio. Los pacientes mayores se encontraron más tiempo por encima del rango terapéutico de INR (R^2 : 0.068; $p=0.004$), y menor tiempo por debajo del rango terapéutico de INR (R^2 : 0.036; $p=0.035$), especialmente después del primer mes.

Ninguno de los otros parámetros clínicos analizados mostró influencia sobre el tiempo dentro/fuera del rango terapéutico de INR o el alcance de la estabilidad anticoagulante en cualquiera de los periodos de estudio.

Tabla 3. Variables respuesta a lo largo de los periodos estudiados

Variable respuesta		n	0-1 Mes	n	0-7 Meses	1-7 Meses
% Tempo dentro de rango		123	33±26	128	57±17	61±19
% Tempo encima de rango		123	11 [0-56]	128	19±16	15 [2-28]
% Tempo debajo de rango		123	28 [12-65]	128	19 [9-36]	17 [5-31]
Alcance de la estabilidad (n,%)		123	5/123 (4.1)	128	82/128 (64.1)	79/128 (61.7)
Tiempo necesario hasta alcanzar estabilidad (Días)		123	-	128	118±53	121±51
Riesgo de sobreanticoagulación (INR>4) (n,%)		123	29/123 (23.6)	128	71/128 (55.5)	60/128 (46.9)
Riesgo de sobreanticoagulación severa (INR>6) (n,%)		123	5/123 (4.1)	128	24/128 (18.2)	16/128(12.5)
Reacciones adversas	Eventos hemorrágicos (n,%)	123	4/123 (3.3)	128	16/128 (12.5)	12/128 (9.4)
	Accidente isquémico transitorio (n,%)		1/123 (0.8)		1/128 (0.8)	1/128 (0.8)
Las variables cuantitativas normales se expresan como media ± desviación estándar. Las variables no normales se expresan como mediana [P ₂₅ -P ₇₅]						

5.1.2.1. Sobreanticoagulación y eventos hemorrágicos.

Después de siete meses, el riesgo de presentar sobreanticoagulación severa en alguna ocasión se asoció a mujeres (RR: 2.4; IC_{95%}:1.1-5.2; $p=0.02$). No se presentaron hemorragias mayores. Hubo 16 episodios hemorrágicos menores en 16 pacientes durante los primeros siete meses de tratamiento (Tabla 3). Los parámetros clínicos no se asociaron con mayor riesgo de presentar episodios hemorrágicos. Un paciente presentó tres episodios de accidente isquémico transitorio (AIT), el primero ocurrió durante el primer mes de tratamiento, y los dos últimos en el quinto mes.

5.1.3. Análisis genético

La distribución genotípica se muestra en la Tabla 4. Todos los polimorfismos genéticos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción de APOE. La Tabla 4 muestra también la distribución de los haplotipos en los genes CYP2C9 y APOE en esta población. En particular, se encontraron 3 pacientes homocigotos para CYP2C9*2 y un paciente homocigoto para CYP2C9*3 (*3/*3); estas variantes alélicas que rara vez se encuentran en caucásicos (50).

Tabla 4. Distribución genotípica

Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia n (%)	Hardy-Weinberg χ^2
CYP2C9*3 rs1057910 n=128	AA	112 (87.5)	0.39
	AC	15 (11.7)	
	CC	1 (0.8)	
CYP2C9*2 rs1799853 n=128	CC	91 (71.1)	0.01
	CT	34 (26.6)	
	TT	3(2.3)	
VKORC1*3 rs9923231 n=128	CC	49 (38.3)	0.98
	CT	56 (43.8)	
	TT	23 (18.0)	
CYP4F2*3 rs2108622 n=128	CC	47 (36.7)	0.43
	CT	64 (50.0)	
	TT	17 (13.3)	
ABCB1 rs1045642 n= 128	CC	33 (25.8)	0.03
	CT	63 (49.2)	
	TT	32 (25.0)	
APOE rs429358 n= 127	CC	9 (7.1)	16.81
	CT	21 (16.5)	
	TT	97 (76.4)	
APOE rs7412 n= 127	CC	117 (92.1)	23.21
	CT	10 (7.9)	
	TT	-	
CYP2C19*2 rs4244285 n= 123	GG	92 (74.8)	0.03
	AG	29 (23.6)	
	AA	2 (1.6)	
CYP2C19*17 rs12248560 n= 123	CC	71 (57.7)	0.11
	CT	44 (35.8)	
	TT	8 (6.5)	
CYP2C9 haplotype n= 128	*1/*1	76 (59.4)	-
	*1/*2	33 (25.8)	
	*1/*3	14 (10.9)	
	*2/*2	3 (2.3)	
	*2/*3	1 (0.8)	
	*3/*3	1 (0.8)	
APOE haplotype n= 126	E2/E3	9 (7.1)	-
	E3/E3	87 (69.0)	
	E3/E4	21 (16.7)	
	E4/E4	9 (7.1)	

5.1.4. Influencia de los polimorfismos genéticos en el tiempo dentro/encima/debajo de rango terapéutico de INR

Las figuras 2 y 3 muestran la asociación de los polimorfismos genéticos con el porcentaje de tiempo dentro/encima/debajo de rango terapéutico de INR. El porcentaje de tiempo dentro de rango terapéutico de INR fue mayor para los pacientes portadores de la variante alélica CYP2C19*17 después de siete meses de tratamiento (Figura 3: 71% vs 56% en los wild-type, $p=0.030$).

Durante el primer mes de tratamiento, el tiempo fuera de rango (encima/debajo) resultó asociado a CYP2C9, VKORC1 y APOE (E3/E3) (Figuras 2 y 3). Los pacientes portadores del alelo T para CYP2C9*2, para VKORC1 o genotipo E3/E3 estuvieron más tiempo por encima del rango terapéutico de INR que el resto de los pacientes. El análisis multivariante confirmó influencia independiente para la edad, alelo T para VKORC1 y genotipo E3/E3 para APOE (Tabla 5).

Se encontraron asociaciones similares después de siete meses de tratamiento (Figura 2). El efecto del haplotipo CYP2C9 no se mantuvo después de siete meses, pero la influencia de VKORC1 se conservó (Figura 2). La presencia del alelo T aumentó gradualmente el tiempo por encima del rango terapéutico de INR hasta el 56% (Figura 2; $p=5 \cdot 10^{-7}$) y 30% [21-34] en los pacientes homocigotos (Figura 2; $p=10^{-4}$) después de uno a siete meses. Consistentemente, la combinación de variantes alélicas en CYP2C9*2, *3 ó VKORC1 también resultó asociada con mayor tiempo por encima de rango terapéutico de INR (7% [0-19] vs. 19% [6-31] en pacientes wild-type; $p=0.05$). Para el genotipo APOE, la asociación con tiempo por encima de rango terapéutico de INR no se mantuvo después de siete meses (Figura 3).

El tiempo por encima de rango terapéutico de INR también resultó asociado al genotipo en ABCB1 durante los siete meses de seguimiento (Figure 3). Los pacientes con genotipo TT sobrepasaron el INR terapéutico mucho menos frecuentemente que los portadores del alelo C durante los siete meses de tratamiento (8% [0-17] vs 20% [6-32]; $p=0.002$). De hecho, el tiempo que permanecieron por encima del rango terapéutico permaneció constante durante todo el seguimiento (alrededor de 8%) (Figura 3).

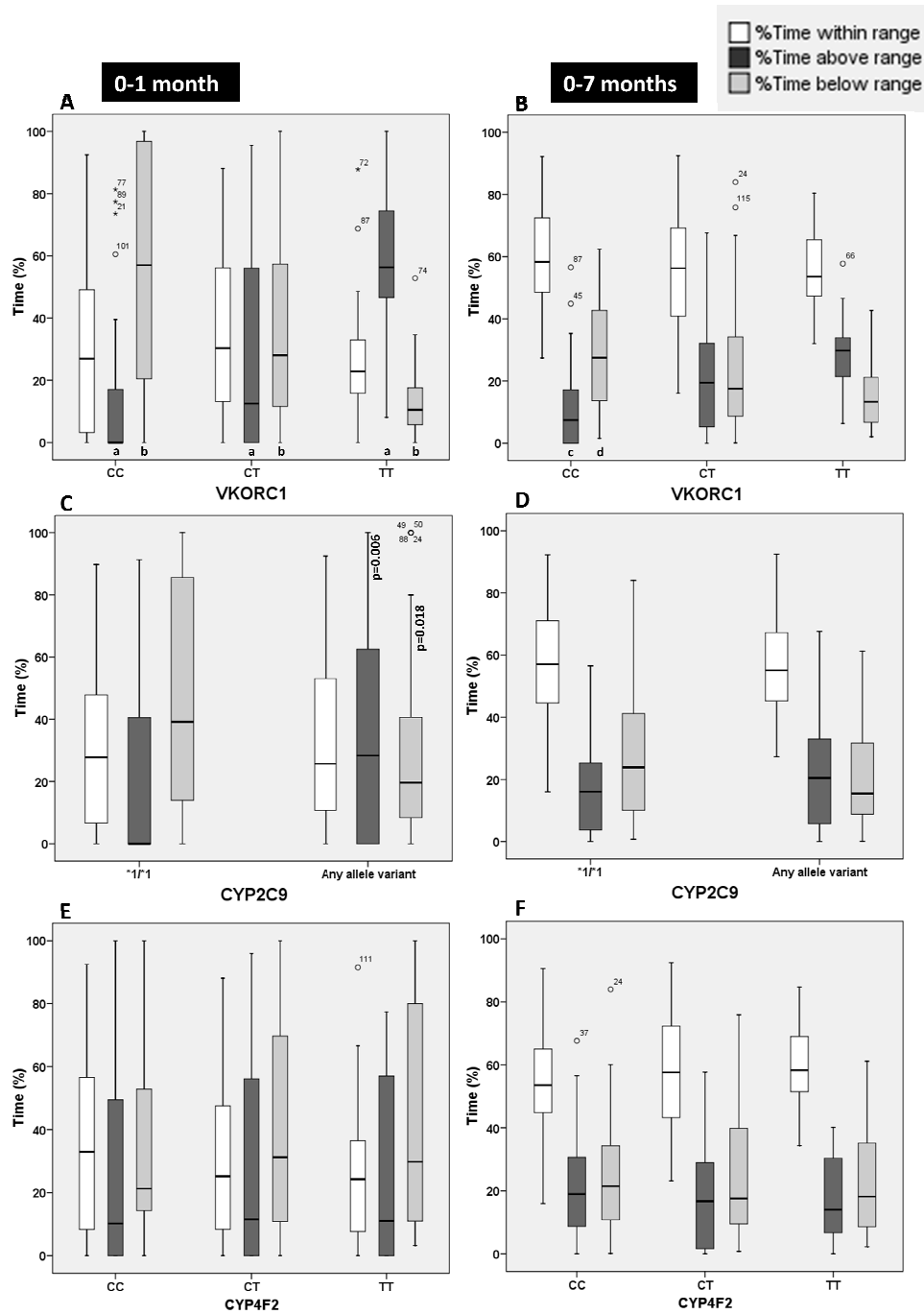
El análisis multivariante confirmó la asociación independiente de edad, genotipo TT para VKORC1 y para ABCB1 con el tiempo por encima del rango terapéutico de INR después de siete meses de tratamiento. El conjunto de estas tres variables fue capaz de explicar más del 25% de la variabilidad total en el tiempo por encima del rango terapéutico (Tabla 5).

La influencia del genotipo VKORC1 en el tiempo por encima del rango terapéutico de INR se mantuvo consistentemente para el tiempo por debajo de rango terapéutico durante todo el

periodo de seguimiento, pero con el efecto contrario: los pacientes con el alelo C para VKORC1 pasaron más tiempo por debajo de rango terapéutico, mientras que los pacientes que se encontraron menos tiempo infraanticoagulados fueron los que presentaron el genotipo TT para este gen (Figura 2). El efecto de CYP2C9 fue solamente relevante durante el primer mes de la terapia, demostrando menor tiempo por debajo de rango terapéutico de INR en los pacientes portadores del alelo T para CYP2C9*2 o de cualquier variante alélica (*2 ó *3) (Figura 2).

No se encontraron diferencias para el tiempo dentro/fuera de rango terapéutico de INR para el resto de los polimorfismos estudiados.

Figura 2. Influencia de los polimorfismos genéticos en el tiempo dentro/encima/debajo de rango terapéutico de INR durante el primer mes y durante siete meses de seguimiento.



a: Diferencias en tiempo encima de rango entre genotipos de VKORC1 en el primer mes (CC-CT:p=0.002; CC-TT: $p=1 \cdot 10^{-8}$; CT-TT:p=0.0002).

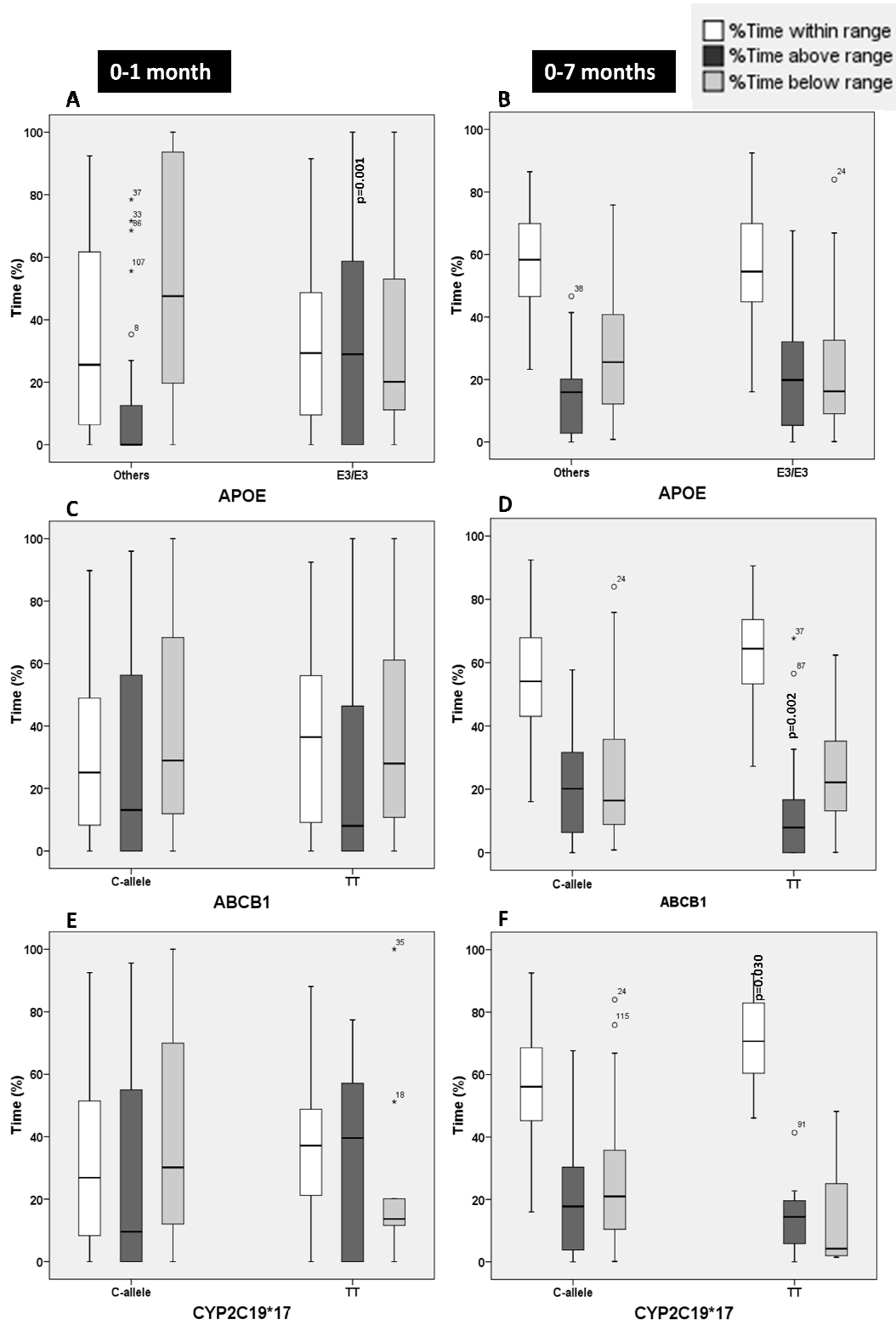
b: Diferencias en tiempo debajo de rango entre genotipos de VKORC1 en el primer mes (CC-CT:p=0.007; CC-TT: $p=2 \cdot 10^{-6}$; CT-TT:p=0.002).

c: Diferencias en tiempo encima de rango entre genotipos de VKORC1 en siete meses (CC-CT:p=0.001; CC-TT: $p=6 \cdot 10^{-7}$)

d: Diferencias en tiempo debajo de rango entre genotipos de VKORC1 en siete meses (CC-TT: $p=0.006$).

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

Figura 3. Influencia de los polimorfismos genéticos en el tiempo dentro/encima/debajo de rango terapéutico de INR durante el primer mes y durante siete meses de seguimiento.



5.1.5. Influencia de los polimorfismos genéticos en el alcance de la estabilidad anticoagulante y tiempo necesario hasta alcanzar estabilidad anticoagulante

La figura 4 muestra el tiempo necesario para alcanzar la dosis estable en función del gen VKORC1.

En el primer mes de tratamiento con acenocumarol, cuando sólo el 4% (5/123; Tabla 3) de los pacientes habían alcanzado la estabilidad, no se encontraron diferencias significativas para ningún polimorfismo genético sobre el alcance de la estabilidad o el tiempo necesario para lograr la estabilidad. Después de siete meses de tratamiento, cuando el 64% (82/128) de la cohorte había logrado alcanzar la dosis estable, el análisis multivariante demostró que el genotipo de VKORC1 estuvo asociado al alcance de la estabilidad, mostrando diferencias entre los pacientes con genotipo CT/TT vs CC (Tabla 6 y Figura 4A). En general, el alelo T para VKORC1 fue más frecuente en los pacientes que eran incapaces de alcanzar la estabilidad en este periodo de tiempo (alelo-T 71.4% vs 28.6% genotipo CC; $p=0.012$). De hecho, el 55,7% de la cohorte que presentaba el alelo T para VKORC1 había alcanzado la estabilidad después de siete meses, mientras que ese mismo porcentaje fue alcanzado por los pacientes con genotipo CC en aproximadamente 4 meses, y finalmente un 78% lograron la estabilidad anticoagulante después de siete meses (Figura 4). Como era de esperar, los portadores del alelo T para VKORC1 necesitaron más tiempo para lograr la estabilidad anticoagulante (Figura 4B, $p=0.004$). No se encontraron diferencias significativas para ningún otro polimorfismo genético.

Figura 4. Alcance de la estabilidad anticoagulante y tiempo necesario hasta alcanzar estabilidad anticoagulante

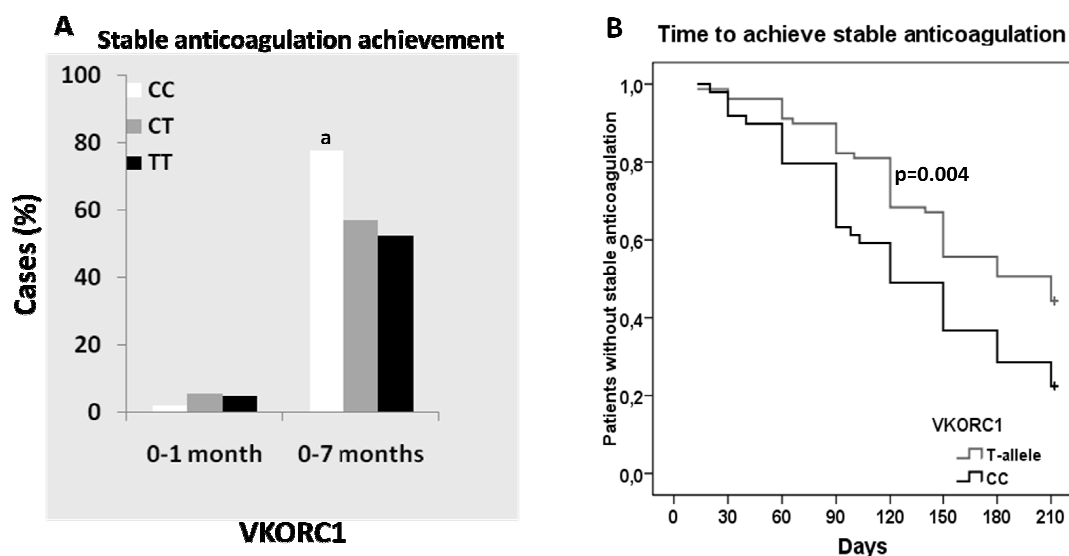


Figura 4: a: Diferencias en el alcance de la estabilidad anticoagulante (CC-CT: $p=0.027$; CC-TT: $p=0.029$)

5.1.6. Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de sobreanticoagulación y de eventos hemorrágicos

Las figuras 5-7 muestran la influencia de los polimorfismos genéticos en la seguridad del tratamiento con acenocumarol, que fue medido como el riesgo de sobreanticoagulación (INR>4), de sobreanticoagulación severa (INR> 6) y de la presentación de episodios hemorrágicos.

La influencia más fuerte en sobreanticoagulación se encontró para el polimorfismo genético en VKORC1. La presentación de algún INR>4 fue mayor en los pacientes portadores del alelo T para VKORC1 a lo largo de todo el periodo de estudio (Figura 5). En el primer mes de tratamiento, la sobreanticoagulación sólo se asoció a los portadores del alelo T para VKORC1 (RR: 2.4; IC_{95%}: 1.0-5.4; p=0.026). De hecho, el 82,6% de los pacientes TT para VKORC1 presentaron al menos un INR>4 en los primeros 25 días de tratamiento (Figura 5A), mientras que el resto de la cohorte presentó algún INR>4 de una manera más progresiva a lo largo de todo el seguimiento. Después de siete meses, sólo el 34,7% de CC con los pacientes y el 58,9% de los pacientes CT presentaron algún INR>4, vs 91.3% de los pacientes TT para VKORC1 (Figura 5A; RR (TT/CC): 2.6; IC_{95%}: 1.8-3.9; p=7·10⁻⁶; RR (CT/CC):1.5; IC_{95%}: 1.2-1.9; p=0.001).

Los pacientes WT para CYP2C9*3 presentan algún INR>4 de manera gradual lo largo del tratamiento, mientras que el 91.7% (11/12) de los eventos de sobreanticoagulación en portadores de alelo C se produjeron antes de 76 días de tratamiento (Figura 5B, p=0.037).

La presentación de algún INR>4 después de siete meses de tratamiento también estuvo influenciado por el gen ABCB1 (Figura 5C), siendo mayor (63.5% vs 31.3%) en los pacientes portadores de alelo C (Figura 5C; RR:2.0; IC_{95%} :1,2-3.5, p=0.001). Después de dos semanas de tratamiento, los portadores del alelo C igualaron la frecuencia de algún INR>4 que aquéllos con genotipo TT en el periodo de siete meses (Figura 5C).

El análisis multivariante confirmó la asociación independiente del alelo T para VKORC1 con una mayor riesgo de presentación de INR>4 en el primer mes de la terapia y el genotipo TT para ABCB1 y VKORC1 después de siete meses de tratamiento (Tabla 5).

Figura 5. Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de sobreanticoagulación después de uno y siete meses de tratamiento con acenocumarol

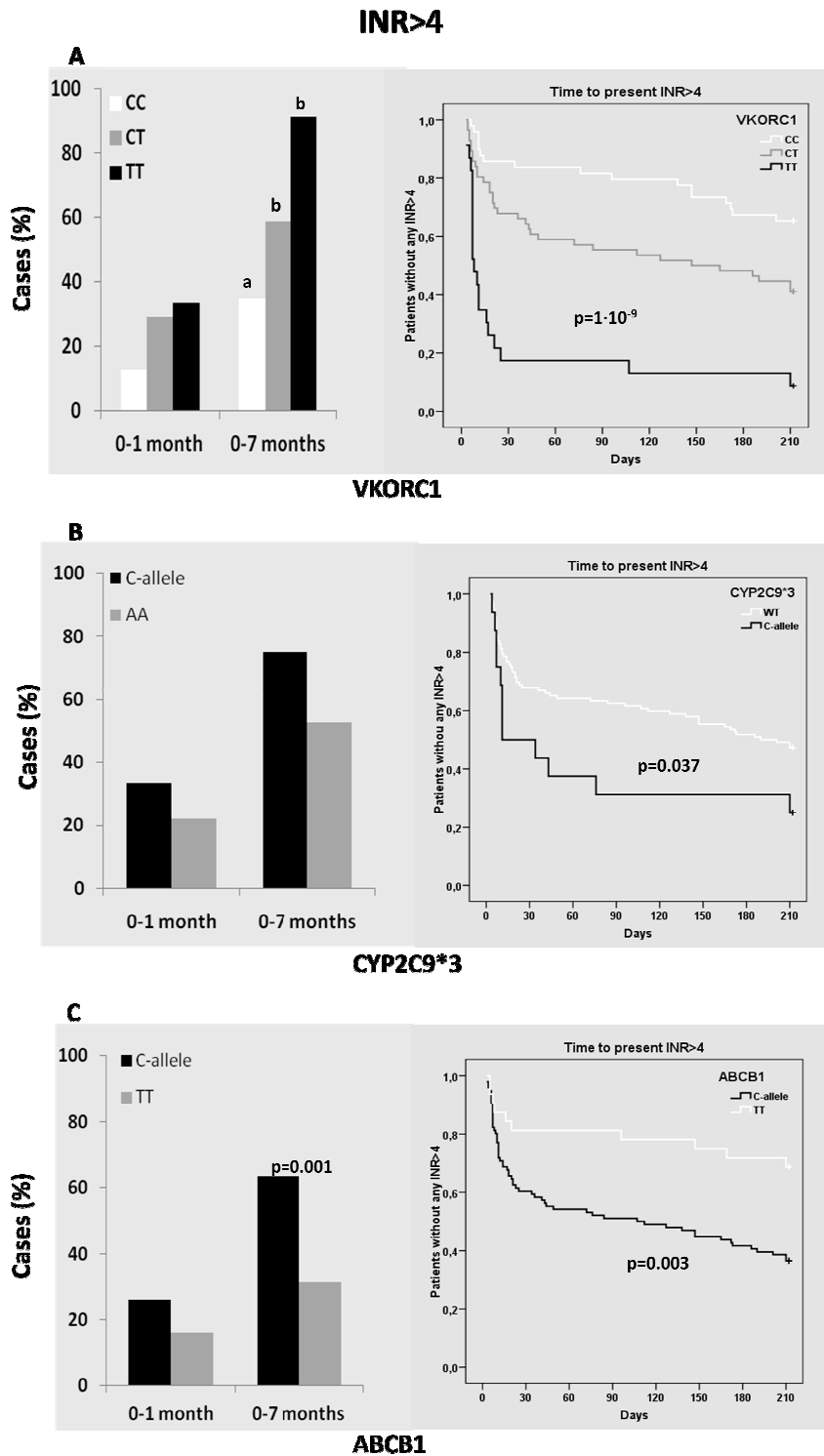
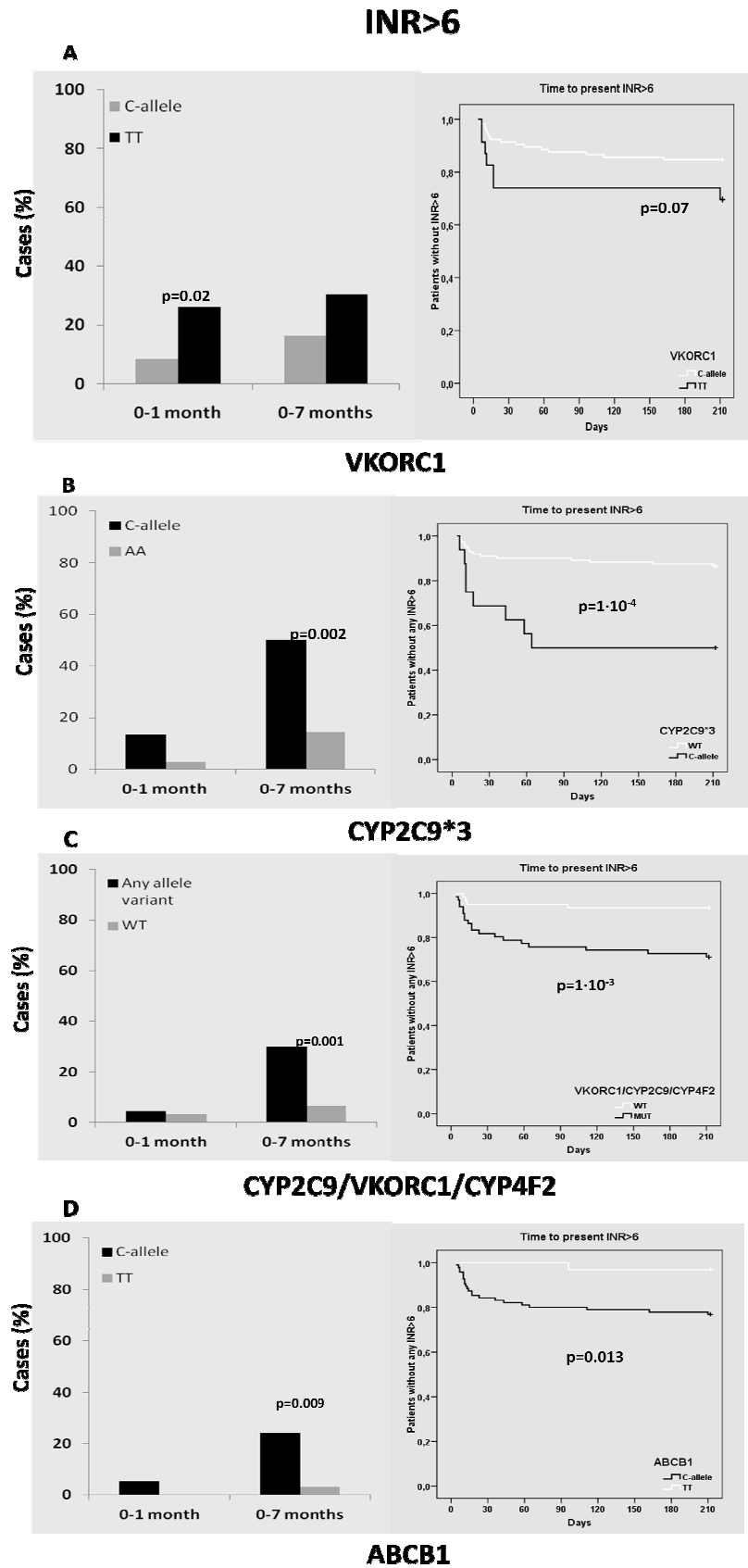


Figura 5. a: Diferencias en la presentación de algún INR>4 (CC-CT: $p=0.001$; CC-TT: $p=7 \cdot 10^{-6}$)
b: Diferencias en la presentación de algún INR>4 (CT-TT: $p=0.0036$).

La presentación de INR>6 fue de 4.1% (5/123) en el primer mes de tratamiento y de 18.2% (24/128) después de siete meses de tratamiento (Tabla 4). El genotipo TT para VKORC1 sólo mostró influencia sobre INR>6 durante el inicio de la terapia, con un RR de 3.4 (IC_{95%}: 1.3-8.8; p=0.02). El 85.7% de los episodios de sobreanticoagulación severa en estos pacientes tuvo lugar antes de 17 días de tratamiento (Figura 6A) . Después de siete meses de tratamiento con acenocumarol, el alelo C para CYP2C9*3 y su combinación con VKORC1 y CYP4F2 resultaron asociados a una mayor incidencia de INR>6 (Figuras 6B y 6C). Los pacientes portadores del alelo C para CYP2C9*3 presentaron un RR para presentar algún INR>6 de 3.5 (IC_{95%}: 1.8-6.8; p=0.002), presentándose todos los casos en los dos primeros meses (Figura 6B). El RR para INR>6 en pacientes con cualquier variante alélica en CYP2C9/VKORC1 y wild-type para CYP4F2 fue de 4.6 (IC_{95%}: 1.6-13, p=0.001, Figura 6C).

Los pacientes con genotipo TT para ABCB1 también mostraron una menor presentación de episodios de INR>6 después de este periodo (Figura 6D; RR: 7.7; IC_{95%}: 1.1-55; p=0.009). La mayoría de los episodios de INR>6 se presentaron en los dos primeros meses (19/22; 86,4%; Figura 6D). El análisis multivariante estableció asociaciones independientes para el género femenino, el alelo C para CYP2C9*3 y el genotipo TT para ABCB1 (Tabla 5).

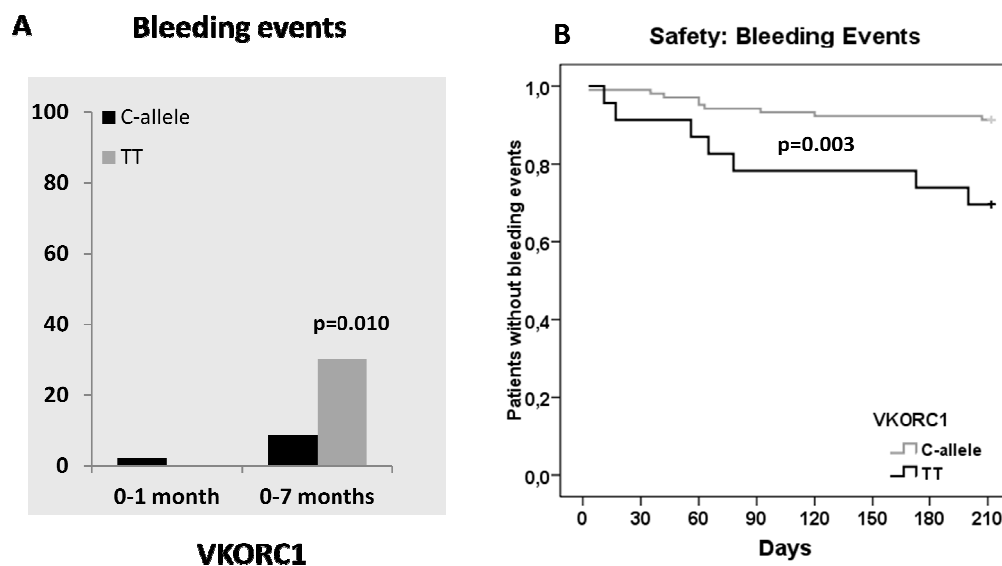
Figure 6. Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de sobreanticoagulación después de uno y siete meses de tratamiento con acenocumarol



La ocurrencia de episodios hemorrágicos fue significativamente mayor en los pacientes con genotipo TT para VKORC1 en comparación con los pacientes con genotipo CC/CT después de siete meses (RR: 3.5; IC_{95%}: 1.4-8.4; p=0.010; Figura 7A). De hecho, el 71.4% (5/7) de los episodios hemorrágicos en pacientes con genotipo TT para VKORC1 se produjo durante el primer tercio del seguimiento (Figura 7B).

El genotipo del paciente que presentó tres episodios de AIT resultó wild-type para CYP2C9 y VKORC1, y TT para CYP4F2 y ABCB1, todos genotipos asociados a requerimientos de dosis más altas de los antagonistas de la vitamina K. Al final de este estudio, este paciente no había alcanzado la dosis óptima, después de un año de tratamiento con acenocumarol.

Figura 7. Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de hemorragia después de uno y siete meses de tratamiento con acenocumarol y tiempo necesario para presentar algún evento hemorrágico



5.1.7. Periodo 1-7 meses

También se evaluaron las variables de respuesta omitiendo el primer mes de acenocumarol tratamiento con el objetivo de evitar el periodo de titulación más intenso (27, 113). Durante este periodo, el 62% (79/128) de los pacientes alcanzó una dosis estable, requiriendo 121±51 días (Tabla 3). Durante estos seis meses de tratamiento, los pacientes se mantuvieron dentro de rango terapéutico de INR durante un 61±19% del tiempo. El 47% (60/128) de los pacientes presentaron algún INR>4, y el 12.5% (16/128) algún INR>6 (Tabla 4). Todos los episodios hemorrágicos fueron no mayores y se presentaron en el 9.4% (12/128) de los pacientes. Un paciente tuvo un AIT durante este periodo (Tabla 3).

El alelo T para VKORC1 ejerció un efecto acumulativo en el aumento del tiempo por encima del rango terapéutico de INR 20 [8-32] vs 8 [0-19]; $p=2 \cdot 10^{-4}$), y mayor ocurrencia de episodios algún INR>4 (RR: 1.9; IC_{95%}: 1.2-3; $p=0.004$). Como en periodos anteriores, el alelo T para VKORC1 mostró una influencia en el alcance de la estabilidad (Tabla 6; OR: 0.4; CI_{95%}: 0.2-0.9; $p=0.033$), ya que los pacientes estables presentaron principalmente genotipo CC (53,4% portadores del alelo T vs 70.4% con genotipo CC; $p=0.045$). El genotipo TT para ABCB1 también mostró un efecto sobre la disminución del tiempo por encima del rango terapéutico de INR (7 [0-14] vs 20 [6-31]; $p=0.001$), y menor incidencia de INR> 4 (28.1 vs 53.1; $p=0.014$). El análisis multivariante confirmó la influencia independiente del alelo T para VKORC1 y el genotipo TT para ABCB1 en el tiempo por encima del rango terapéutico de INR y sobre la presentación de algún INR>4 (Tabla 6). El tiempo por encima del rango terapéutico de INR fue del 26.8% [19.7-38.9] para los pacientes VKORC1-TT/ABCB1-C (16/128) vs 0.86% [0-11,1] para los pacientes VKORC1-CC/ABCB1-TT (14/128) ($p<0.00001$). Además, los pacientes VKORC1-TT/ABCB1-C presentaron algún INR>4 con mayor frecuencia que el resto (RR:1.8; IC_{95%}: 1.2-2.5; $p=0.015$).

La presentación de algún INR>6 fue significativamente mayor en los pacientes portadores del alelo C para CYP2C9*3 (31.3% vs 9.8%; $p=0.030$) o del alelo C para ABCB1 (15.6% vs 3.1%; $p=0.018$). El análisis multivariante confirmó la Influencia independiente del alelo C para CYP2C9*3 en la presentación de algún INR>6 (Tabla 5).

Los episodios hemorrágicos sólo estuvieron influenciados por el genotipo TT en VKORC1 durante los últimos 6 meses de tratamiento (Tabla 6; 26.1% vs 5.8%; $p=0.008$).

Tabla 5. Análisis multivariante

Variables respuesta	Factor independiente	Categoría de referencia	Intervalo		
			0-1 Meses	0-7 Meses	1-7 Meses
% Tempo dentro de rango	-	-	-	-	-
% Tempo encima de rango	-	-	R ² :0.382 Y=-4.2 + 0.68(Age)+2.2 (VKORC1-CT)+5.1(VKORC1-TT)+1.5 (E3/E3) p=0.018;0.0002; 8·10 ⁻¹⁰ ;0.011, respectively	R ² : 0.285 y= -0.3+0.046(Age)+1.2 (VKORC1-CT)+2.5(VKORC1-TT)-1.3(ABCB1-TT) p= 0.013; 0.001;7·10 ⁻⁷ ;0.001, respectively	R ² : 0.187 y= 3.0+1.0·(VKORC1-CT)+2.1·(VKORC1-TT) - 1.5·(ABCB1-TT) p= 0.015; 0.0001; 0.001, respectively
% Tempo debajo de rango	-	-	R ² :0.258 Y=7.8-1.7 (VKORC1-CT)-3.5 (VKORC1-TT)-1.1(E3/E3) p=0.01; 4·10 ⁻⁷ ;0.030	-	-
Alcance de la estabilidad anticoagulante	VKORC1-CT	CC	-	OR:0.4;CI _{95%} :0.2-0.9;p=0.029	-
	VKORC1-TT	CC	-	OR:0.3;CI _{95%} :0.1-0.9;p=0.033	-
	VKORC1 (T-)	CC	-	-	OR:0.4;CI _{95%} : 0.2-0.9;p=0.033
INR>4	Alelo C-CYP2C9*3	WT	-	-	-
	VKORC1-CT	CC	-	OR:2.6;CI _{95%} :1.1-6.0;p=0.025	-
	VKORC1-TT	CC	-	OR:32;CI _{95%} :6-175;p=8·10 ⁻⁵	-
	Alelo T-VKORC1	CC	OR:1.3;CI _{95%} :1.2-11;p=0.022	-	OR:2.9;CI _{95%} :1.4-6.4;p=0.006
	ABCB1-TT	Alelo C	-	OR:0.2;CI _{95%} :0.1-0.5;p=0.001	OR:0.3;CI _{95%} :0.1-0.9;p=0.021
INR>6	Mujeres	Hombres	-	OR:2.9;CI _{95%} :1.1-8.0;p=0.034	
	Alelo C-CYP2C9*3	WT	-	OR:5.5;CI _{95%} :1.8-17;p=0.003	OR:4.2;CI _{95%} :1.2-14;p=0.022
	Alelo C-ABCB1	TT	-	OR:8.9;CI _{95%} :1.1-70;p=0.039	-
Eventos hemorrágicos	VKORC1-TT	CC	-	OR:4.6;CI _{95%} :1.5-14;p=0.007	OR:5.8;CI _{95%} :1.7-20;p=0.006

5.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL

5.2.1. Características clínicas de los pacientes

La cohorte total se compuso de 164 pacientes. Esta cohorte de pacientes se distribuyó aleatoriamente en dos cohortes; la cohorte de derivación, compuesta por 134 pacientes (134/164; 81.7%), y la cohorte de validación compuesta por 30 pacientes (30/164; 18.3%). Como se muestra en la Tabla 6, no hubo diferencias entre las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes de las cohortes de derivación y validación. La edad media de la cohorte total fue de 74 (67-80) años, y el 54.3% (89/164) eran hombres. La indicación más frecuente para la anticoagulación oral fue fibrilación auricular (82.3%; 135/164). Los fármacos más prescritos de manera concomitante con el tratamiento anticoagulante oral con acenocumarol fueron omeprazol (46,3%; 76/164), estatinas (34,8%; 57/164) y amiodarona (2,4; 4/164). La mediana de la dosis estable fue de 14 [10-18] mg/semana.

La Tabla 6 muestra la comparación de la distribución de las variables clínicas entre la cohorte de derivación y la cohorte de validación.

VARIABLES	COHORTE TOTAL	COHORTE DERIVACIÓN	COHORTE VALIDACIÓN	p (CD vs CV)
Pacientes	164	134	30	
Edad	73±9	73±10	73±8	0.771
Género (Femenino)	75/164 (45.7)	59/134 (44.0)	16/30 (53.3)	0.355
Indicación Fibrilación auricular	135/164 (82.3)	109/134 (81.3)	26/30 (86.7)	0.490
Enfermedad tromboembólica venosa	29/164 (17.7)	25/134 (18.7)	4/30 (13.3)	
Índice de masa corporal (Kg/m²)	30 [27-33]	29 [27-33]	32±5.7	0.201
Omeprazol	76/164 (46.3)	64/134 (44.8)	16/30 (53.3)	0.396
Estatinas	57/164 (34.8)	45/134(33.6)	12/30 (40.0)	0.505
Amiodarona	4/164 (2.4)	4/134 (3.0)	0/30 (0.0)	0.345
Hábito tabáquico	6/139 (4.3)	4/111(3.6)	2/28 (7.1)	0.410
Consumo de alcohol	48/139 (34.5)	39/111(35.1)	9/28 (32.1)	0.766
Dosis estable (mg/semana)	14 [10-18]	13 [10-18]	14.6±5.0	0.488

Las variables normales: media ± desviación estándar (p: t de Student). Las variables no normales: mediana [P25-P75] (p: U-Mann Whitney).

Tabla 6. Comparación de las variables clínicas y sociodemográficas entre cohortes

5.2.2. Análisis genotípico

Todos los polimorfismos genéticos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de la cohorte de derivación con la cohorte de validación (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de genotipos de la cohorte de derivación y de la cohorte de validación.

Variables		Cohorte Derivación N=134	Cohorte Validación N=30	p
CYP2C9*3rs1057910	AA	116 (86.6)	26 (86.7)	0.513
	AC	18 (13.4)	3 (10.0)	
	CC	0 (0.0)	1 (0.0)	
CYP2C9*2 rs1799853	CC	97 (72.4)	23 (76.7)	0.710
	CT	33 (24.6)	6 (20.0)	
	TT	4(3.0)	1(3.3)	
VKORC1*3 rs9923231	CC	48 (35.8)	11 (36.7)	0.941
	CT	60(44.8)	14(46.7)	
	TT	26 (19.4)	5 (16.7)	
CYP4F2*3 rs2108622	CC	42 (31.6)	13 (44.8)	0.169
	CT	76 (57.1)	14 (48.3)	
	TT	15 (11.3)	2 (6.9)	
ABCB1 C3435T	CC	36 (26.9)	10 (33.3)	0.659
	CT	67 (50.0)	15 (50.0)	
	TT	31(23.1)	5 (16.7)	
APOE rs429358	CC	9 (6.7)	1 (3.3)	0.759
	CT	24 (17.9)	5(16.7)	
	TT	101(75.4)	24 (80.0)	
APOE rs7412	CC	123 (91.8)	27 (90.0)	0.722
	CT	11 (8.2)	3 (10.0)	
CYP2C19*2 rs4244285	GG	84 (62.7)	19 (63.3)	0.525
	AG	32 (23.9)	5 (16.7)	
	AA	18 (13.4)	6(20.0)	
CYP2C19*17 rs12248560	CC	73 (55.7)	21 (70.0)	0.094
	CT	48 (36.6)	5 (16.7)	
	TT	10 (7.6)	4 (13.3)	
GGCX rs12714145	CC	39(29.3)	9 (30)	0.5296
	CT	69(51.9)	18 (60)	
	TT	25(18.8)	3 (10)	
GGCX rs11676382	CC	113(84.3)	24 (82.8)	0.785
	CG	21 (15.7)	5 (17.2)	
CYP2C9 Haplotipo	*1/*1 (WT)	82 (61.2)	19 (63.3)	0.389
	*1/*2	30 (22.4)	6 (20.0)	
	*1/*3	15 (11.2)	3 (10.0)	
	*2/*2	4 (3.0)	1 (3.3)	
	*2/*3	3 (2.2)	0	
	*3/*3	0 (0.0)	1 (3.3)	
APOE Haplotipo	E2/E3	11 (8.2)	3 (10.0)	0.899
	E3/E3	90 (67.2)	21 (70.0)	
	E3/E4	24 (17.9)	5 (16.7)	
	E4/E4	9 (6.7)	1 (3.3)	

5.2.3. Requerimiento de dosis estable de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas

La mediana de la dosis estable de acenocumarol fue de 13 [10-18] mg/semana. Los pacientes mayores requirieron dosis estables más bajas ($p=0.012$) (Figura 8A). La dosis estable también estuvo influenciada por el índice de masa corporal ($p=0.037$), con un aumento gradual en la dosis para los pacientes con elevado índice de masa corporal (Figura 8B).

Se observó una tendencia no significativa a necesitar dosis más altas para alcanzar la anticoagulación estable en los pacientes que recibieron administración concomitante de estatinas (13 [9-17] mg/semana vs 14 [11-20] mg/semana; $p=0.062$). Esta variable se consideró en la construcción de los algoritmos para evitar la posible subestimación de su influencia. Se observó un efecto similar en pacientes que recibieron administración concomitante de amiodarona, necesitando dosis más bajas para alcanzar la anticoagulación estable (9 [8-13] mg/semana vs 13 [10-18] mg/semana; $p=0.143$); esta variable también fue considerada en la construcción de los algoritmos.

Se encontró una fuerte asociación entre el genotipo en VKORC1 y el requerimiento de dosis estable (Figura 8C, $p=2 \cdot 10^{-10}$). La dosis estable de acenocumarol necesaria para lograr una anticoagulación estable en los pacientes con genotipo CC fue 27.8% mayor que en los pacientes CT y un 61.1% mayor que en los pacientes TT (Figura 8C).

La dosis estable se asoció al genotipo en CYP2C9*3, de manera que los pacientes wild-type necesitaron mayores dosis de acenocumarol en comparación con los pacientes con genotipo AC (14 [10-19] mg/semana vs. 10 [7-13] mg/semana; $p=0.001$). Los pacientes portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 (cualquier combinación con los alelos *2 ó *3) recibieron dosis 21.4% más bajas que los pacientes wild-type (*1/*1) (Figura 8D).

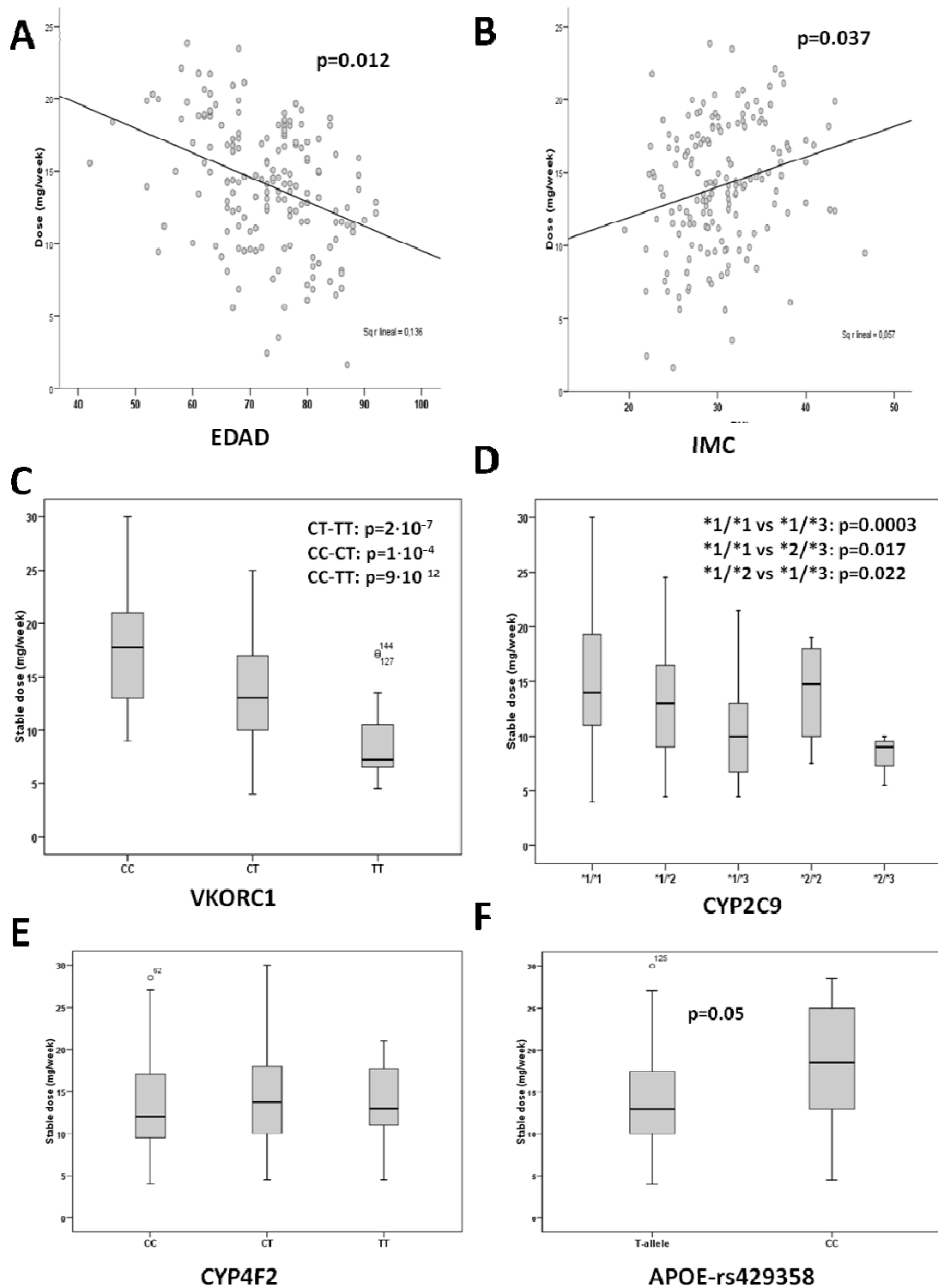
Se encontró una tendencia no estadísticamente significativa entre la dosis y el alelo T para CYP4F2. Los pacientes con el alelo T para CYP4F2 necesitaron dosis mayores que los pacientes wild-type (CC) (14 [10-18] vs. 12 [9-17]; $p=0.257$; Figura 8E), pero esta variable se consideró en la construcción del algoritmo farmacogenético para evitar la posible subestimación de su influencia en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol.

Por último, la dosis estable de acenocumarol fue un 31.6% mayor en los pacientes con genotipo CC para APOE-rs429358 en comparación con el resto ($p=0.05$; Figura 8F).

No se encontraron otras variables clínicas o genéticas que influyesen en la dosis estable de acenocumarol en la cohorte de derivación.

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

Figura 8. Dosis estable de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas de la cohorte de derivación.



5.2.4. Construcción del algoritmo farmacogenético para la predicción de la dosis estable de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas

Para la construcción de los modelos (clínico y farmacogenético), se incluyeron las variables clínicas y genéticas con influencia en la dosis estable de acenocumarol en la cohorte de derivación en el análisis bivalente.

La Tabla 8 muestra las variables incluidas en cada algoritmo (clínico y farmacogenético), el porcentaje de variabilidad explicada por cada variable, y la ecuación resultante para predecir la dosis estable de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas.

El modelo clínico incluyó la edad, el índice de masa corporal y la administración concomitante de estatinas como variables independientes, siendo capaz de predecir hasta un 14% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol (Tabla 8).

En el algoritmo farmacogenético, las variables clínicas que mostraron asociación independiente con la dosis estable de acenocumarol fueron: la edad, el índice de masa corporal y la administración concomitante de amiodarona, explicando el 12.1% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol. Con el fin de homogeneizar los factores clínicos en ambos modelos, se probó la influencia de la administración concomitante de estatinas y de amiodarona en el modelo de regresión lineal, a pesar de no haber mostrado una asociación significativa con la dosis en el análisis bivalente. El análisis multivalente mostró una influencia independiente de la administración concomitante de estatinas en el algoritmo clínico y una influencia independiente para la administración concomitante de amiodarona solo para el modelo farmacogenético (Tabla 8).

Además de las variables clínicas y sociodemográficas, el modelo farmacogenético incluyó en su modelo el haplotipo de CYP2C9 (*1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2), el genotipo de VKORC1 (CC, CT, TT), y el genotipo en APOE-rs429358 (CC). El haplotipo de CYP2C9, compuesto por los polimorfismos rs1799853 y rs1057910, fue capaz de predecir el 9.8% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol. Por otro lado, el polimorfismo en el gen VKORC1 fue la variable predictora con mayor potencia estadística, aportando hasta el 31.5% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol. El genotipo CC para el polimorfismo APOE-rs429358 añadió un 3.9% en la variabilidad total de la dosis estable de acenocumarol.

El modelo farmacogenético fue capaz de explicar hasta el 56.6% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol en la cohorte de derivación.

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

Tabla 8. Construcción de los algoritmos de dosificación de acenocumarol en función de las variables clínicas y genéticas que presentan influencia en la dosis estable.

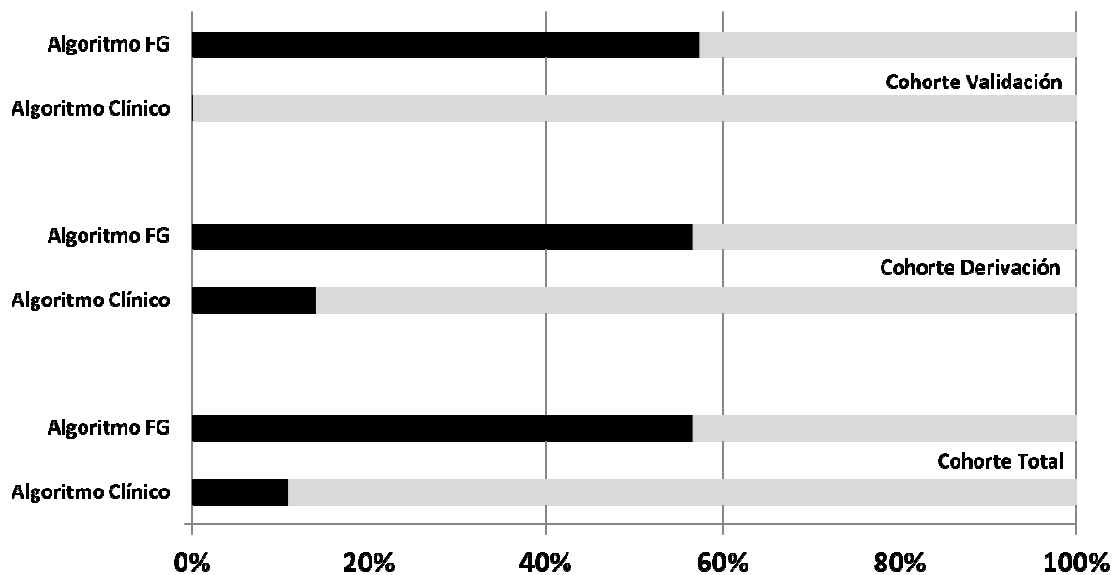
Variables	Algoritmo clínico	Algoritmo farmacogenético	p	R ² acumulado (%)
Constante	15.470	7.962		
Edad (años)	-0.145	-0.116	0.002	6.2
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	0.276	0.286	0.0003	4.4
Estatinas				
Si	2.506	-	0.016	2.8
Amiodarona				
Si	-	-5.295	0.014	1.5
CYP2C9				9.8
(WT)*1/*1	-	10.596	3·10 ⁻⁵	
*1/*2	-	10.586	6·10 ⁻⁵	
*1/*3	-	5.875	0.026	
*2/*2	-	8.387	0.009	
VKORC1-rs9923231				31.5
CT	-	-4.748	5·10 ⁻⁸	
TT	-	-9.388	3·10 ⁻¹⁶	
APOE- rs429358				3.9
CC	-	3.742	0.011	
R² sin ajustar del algoritmo	14.0%	56.6%		

5.2.5. Capacidad predictiva de los modelos clínico y farmacogenético

Los algoritmos de dosificación de acenocumarol se probaron en la cohorte de validación (n=30 pacientes), en la cohorte de derivación (n=134 pacientes), y en la cohorte total (n=164 pacientes).

La capacidad predictiva de cada algoritmo fue comparada entre todas las cohortes. El algoritmo farmacogenético obtuvo una mejor predicción de la dosis estable de acenocumarol (Figura 9). El algoritmo clínico explicó el 10.9% de la variabilidad total de la dosis estable de acenocumarol en la cohorte total, el 14.0% en la cohorte de derivación y un 0.2% en la cohorte de validación, mientras que el algoritmo farmacogenético explicó el 56.6% de la variabilidad total de la dosis estable de acenocumarol en la cohorte total, el 56.6% en la cohorte de derivación y el 57.3% en la cohorte de validación (Figura 9).

Figura 9. Porcentaje de variabilidad de dosis estable de acenocumarol explicada por el algoritmo clínico y farmacogenético.



5.2.6. Exactitud predictiva de los algoritmos

Ambos algoritmos (clínico y farmacogenético) mostraron una pequeña desviación (expresada como ME y ME%) en la predicción de la dosis estable con respecto a la dosis real de los pacientes, debido a desviaciones en ambos sentidos (por encima y por debajo de la dosis real), con una gran variabilidad (Tabla 9). La desviación absoluta de la dosis estable, expresado como MAE, fue ≈ 1.5 veces menor para el algoritmo farmacogenético comparado con el algoritmo clínico, la cual evidencia una mayor precisión en la predicción de la dosis estable de acenocumarol para las tres cohortes, siendo la mediana de MAE% para el algoritmo clínico en la cohorte de validación dos veces mayor que la del algoritmo farmacogenético (Tabla 9). Además, la dosis predicha por el algoritmo farmacogenético presentó una menor variabilidad, con rangos intercuartílicos más estrechos que los presentados por el algoritmo clínico (Tabla 9).

Cohorte	Algoritmo	Desviación				Precisión			
		ME mg/sem	p	% ME	p	MAE mg/sem	p	MAE %	p
Total N=164	Clínico	0.018 \pm 5.5	0.475	1.5 [-20,38]	0.804	3.8 [2,7]	10 ⁻⁷	26.8 [13,46]	4 \cdot 10 ⁻⁷
	FG	-0.01 \pm 3.8		1.1 [-15,21]		2.5 [1,4]		17.7 [8,34]	
Derivación n N=134	Clínico	0.3 \pm 5.5	0.852	3.7 [-2,39]	0.996	4.0 [2,7]	2 \cdot 10 ⁻⁵	26.8 [13,47]	4 \cdot 10 ⁻⁵
	FG	5 \cdot 10-4 \pm 3.8		0.4 [-16,27]		2.7 [1,4]		18.1 [8,36]	
Validación N=30	Clínico	0.04 \pm 5.5	0.959	-9.4 [-19,40]	0.688	3.0 [3,7]	0.001	23.3 [14,46]	0.001
	FG	0.5 [-2,3]		-3.2 [-10,15]		1.9 [1,4]		13.5[8,28]	

FG: Farmacogenético. ME: Error medio en la dosis estable (Dosis predicha-Dosis observada); MAE: Error medio absoluto ($\sqrt{V(ME^2)}$). Variables normales: media \pm desviación estándar (p: t de Student). Variables no normales: mediana [P₂₅,P₇₅] (p: test de Wilcoxon).

Tabla 9. Exactitud predictiva de los algoritmos.

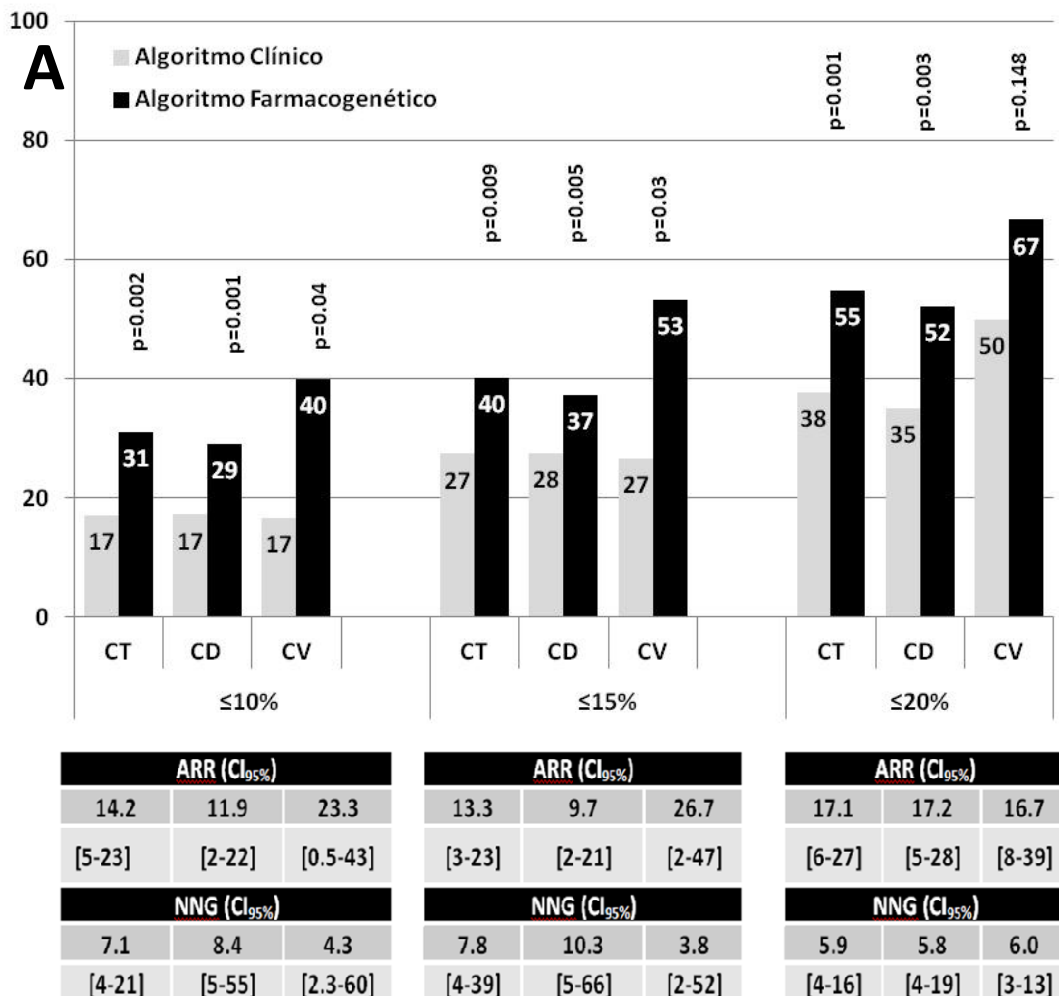
5.2.7. Relevancia clínica de los algoritmos

La relevancia clínica de los algoritmos se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de pacientes cuya dosis predicha de acenocumarol presentaba una desviación menor del 10-15-20% de la dosis estable real (Figura 10A). En la cohorte total, el algoritmo farmacogenético clasificó mejor a los pacientes en comparación con el algoritmo clínico, incluso cuando se consideró la desviación sobre la dosis estable del 10% (Figura 10A). En la cohorte de derivación, el 29% de los pacientes se clasificaron correctamente con el algoritmo farmacogenético considerando una desviación $\leq 20\%$, mientras que el algoritmo clínico sólo alcanzó ese porcentaje cuando se consideró una desviación $\leq 15\%$. En la cohorte de validación,

el 53.3% de los pacientes se encontraron correctamente clasificados ($\leq 15\%$) utilizando el algoritmo farmacogenético, mientras que sólo el 27% de los pacientes se clasificaron correctamente con el modelo clínico (Figura 10A). Dentro del 46.7% (14/30) restante que se encontraron incorrectamente clasificados con el algoritmo farmacogenético, el 92.3% (13/14) de ellos recibió una dosis intermedia (7-21 mg/semana) de acenocumarol y sólo un paciente necesitó una dosis elevada (>21 mg/semana) para alcanzar la anticoagulación estable. La sobreestimación ($>15\%$) y subestimación ($<15\%$) en la predicción de la dosis estable fueron menores para el algoritmo farmacogenético en comparación con el algoritmo clínico para todos los casos (Figura 10B).

El NNG en la cohorte total fue de 5.9 [4-16] pacientes, considerando una desviación del 20% en la predicción de la dosis estable de acenocumarol, y se incrementó hasta aproximadamente 9 cuando se consideraron las desviaciones al 10% y al 15% (Figura 10A). La reducción del riesgo absoluto fue un 17.1% mayor en el algoritmo farmacogenético en comparación con el algoritmo clínico.

Figura 10. Relevancia clínica de los algoritmos.



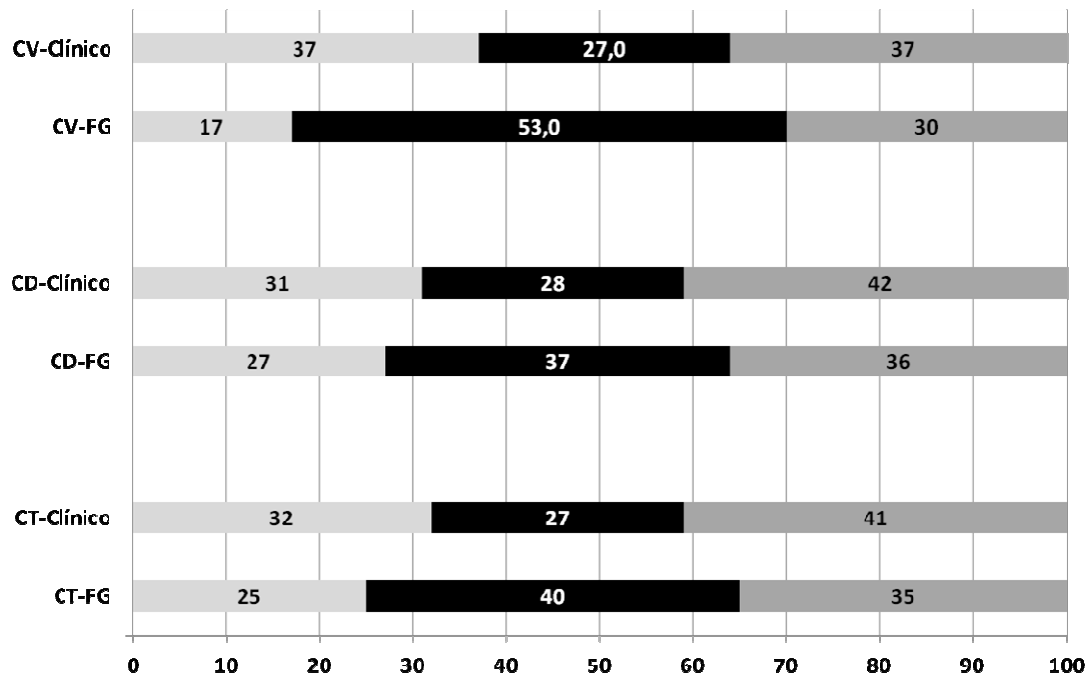
B

Figura 10 A. Pacientes correctamente clasificados por cada algoritmo considerando desviaciones del 10-15-20% en la predicción de la dosis estable de acenocumarol. p: test de McNemar para proporciones pareadas. Reducción absoluta del riesgo (ARR) y el número necesario para genotipar (NNG) en cada cohorte.

Figura 10B. Sobreestimación (gris oscuro) y subestimación (gris claro) en la predicción de la dosis estable ($\leq 15\%$) para cada algoritmo en las tres cohortes. Negro: porcentaje de pacientes correctamente clasificados.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. PARTE I. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA SEGURIDAD DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL

La relevancia de los polimorfismos genéticos en CYP2C9 y VKORC1 en la fase inicial de la terapia con los antagonistas de la vitamina K se ha estudiado ampliamente (27, 48), y su influencia en la dosificación y las reacciones adversas se encuentra bien establecida, especialmente para la terapia de anticoagulación oral con warfarina (31, 147-152). Sin embargo, la influencia de estos genes y otros que pueden identificarse como factores riesgo en el tratamiento de larga duración con acenocumarol se encuentra mucho menos descrita en la literatura (104, 111, 113, 153). La efectividad y la seguridad de los antagonistas de la vitamina K se han asociado estrechamente con el tiempo que permanece el paciente dentro de rango terapéutico de INR (154). La terapia con antagonistas de la vitamina K de larga duración presenta varios inconvenientes, como la necesidad de monitorizar frecuentemente el INR y numerosos ajustes de dosis en el inicio del tratamiento. La reciente incorporación de los nuevos anticoagulantes orales (dabigatrán, rivaroxabán y apixabán) representan una alternativa conveniente para evitar estas desventajas, debido a que presentan un amplio margen terapéutico, dosis fijas y menos interacciones a nivel de CYP450 (117-119). A pesar de estas ventajas, los nuevos anticoagulantes orales no han desplazado a los antagonistas de la vitamina K, que permanecen como los anticoagulantes orales de primera elección en muchos países (121, 122). Los antagonistas de la vitamina K han demostrado similar eficacia y seguridad que los nuevos anticoagulantes orales para la prevención de ictus y embolia sistémica cuando los pacientes son capaces de mantener el rango terapéutico de INR en al menos un 66% del tiempo (117, 118, 123). En el presente estudio se ha evaluado la influencia de los principales polimorfismos genéticos en CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, ABCB1, CYP2C19 y APOE en pacientes tratados con terapia de acenocumarol de larga duración para investigar la influencia potencial de éstos en la seguridad del tratamiento. En estos pacientes, el tiempo dentro del rango terapéutico aumentó a lo largo del periodo de estudio, desde $33\pm 26\%$ después del primer mes hasta $61\pm 19\%$ cuando se consideraron los últimos 6 meses de tratamiento (1-7 meses) con acenocumarol (Tabla 3), similar a resultados encontrados en estudios previos durante el inicio de la terapia (8, 155). Este resultado es inferior al descrito en un ensayo clínico aleatorizado muy reciente que evaluaba la aplicación de una dosificación de acenocumarol guiada por genotipo en la efectividad y seguridad del inicio del tratamiento con acenocumarol y fenprocumón. En dicho estudio, los pacientes del grupo control (aquellos a los que no se les dosificaba en función del algoritmo farmacogenético) se mantuvieron dentro del

rango terapéutico de INR aproximadamente el 50% del tiempo durante el primer mes de tratamiento con acenocumarol (156). Estas diferencias podrían ser debidas a una titulación de la dosis más estrecha en el ensayo clínico, derivada de la elevada monitorización del INR durante este primer mes. Por lo tanto, sería esperable obtener mejores resultados en el tiempo que permanece el paciente dentro del rango terapéutico de INR en comparación con la cohorte de pacientes descrita en nuestra cohorte en el mismo periodo de tiempo (156). Hay que destacar que los datos descritos en el presente estudio son derivados de un estudio observacional, en el que no se realizaron intervenciones y consecuentemente, los datos generados son más representativos de la práctica clínica actual en comparación con los resultados descritos en un ensayo clínico. No obstante, aunque nuestros pacientes estuvieron menos tiempo dentro del rango terapéutico de INR al inicio del tratamiento, la evolución es comparable con la de otros centros, ya que al final del seguimiento los resultados del porcentaje de tiempo dentro del rango terapéutico de INR son similares a los alcanzados por otros autores (8, 155, 156). El tiempo dentro del rango terapéutico de INR fue superior en los pacientes con genotipo TT para ABCB1 o CYP2C19*17 después de 7 meses de terapia anticoagulante con acenocumarol, aunque este modelo fue capaz de explicar únicamente el 9.2% de la variabilidad total (Tabla 5). Este resultado es inesperado ya que estos genes no se habían relacionado anteriormente con el tiempo dentro del rango terapéutico de INR, por lo que es necesario confirmar esta asociación en futuros estudios. En otros estudios de warfarina, CYP2C9 y VKORC1 han mostrado influencia sobre el tiempo que permanecen los pacientes dentro del rango terapéutico de INR (150-152, 157). Sin embargo, para nuestros pacientes el tiempo dentro del rango terapéutico no fue diferente en función de estos polimorfismos genéticos en ningún periodo de estudio, como otros autores han descrito anteriormente (135, 158). En nuestros pacientes, la influencia más relevante sobre el tiempo fuera del rango terapéutico de INR fue la del alelo T de VKORC1, el cual ha demostrado ser un potente marcador predictivo en el tiempo por encima y por debajo del rango terapéutico de INR durante todo el periodo de seguimiento (Tabla 5). Durante el primer mes de tratamiento, VKORC1 y el genotipo E3/E3 para APOE se asociaron independientemente con mayor tiempo por encima del rango terapéutico de INR y menor tiempo por debajo del rango terapéutico de INR (Tabla 6). Por lo tanto, los pacientes portadores del alelo T para VKORC1 o genotipo E3/E3 para APOE deberían ser monitorizados más estrechamente para evitar desviaciones potenciales del INR. Estos resultados añaden un valor importante a la inclusión del genotipo APOE en los algoritmos farmacogenéticos capaces de predecir la dosis estable de los antagonistas de la vitamina K, y apoya la implementación de este gen en la práctica clínica

habitual en el tratamiento de anticoagulación oral de larga duración. La importancia del genotipo TT para VKORC1 en el tiempo fuera del rango terapéutico de INR se mantuvo durante todos los periodos de estudio, reforzando su valor como marcador predictivo en la seguridad de esta terapia. La influencia del genotipo TT en el tiempo por encima de rango terapéutico elevado y el tiempo por debajo de rango terapéutico disminuido confirma los resultados descritos recientemente en el estudio de Verhoef et al (113). En este estudio se analizó el efecto de CYP2C9 y VKORC1 en el tiempo dentro/encima/debajo del rango terapéutico de INR (2-3.5) durante los primeros 18 meses de tratamiento con acenocumarol separados en varios periodos. El efecto del genotipo TT para VKORC1 se mantuvo para el tiempo por encima del rango terapéutico durante los primeros 6 meses de tratamiento, y para el tiempo por debajo del rango terapéutico durante los tres primeros meses (113).

Por otro lado, el alelo C para ABCB1 se ha revelado como un importante marcador predictivo para el tiempo por encima del rango terapéutico de INR después de 6-7 meses de tratamiento con acenocumarol. De acuerdo con esto, nuestros resultados sugieren que los pacientes con el alelo C requerirían dosis más baja para alcanzar la anticoagulación estable en comparación con los pacientes portadores del genotipo TT para este gen. Muy pocos estudios han analizado el papel de ABCB1 en la respuesta farmacológica a los antagonistas de la vitamina K, y éstos se focalizaron en la influencia de este gen en la dosis estable, en ningún caso se ha analizado previamente la influencia de este gen con la seguridad de este tratamiento. En el estudio desarrollado por Wadelius et al. Se encontró que los pacientes heterocigotos para el haplotipo D en ABCB1 (que incluye el polimorfismo C3435T) necesitaron dosis un 24% inferior de warfarina en comparación con el resto (36). Sin embargo, otros investigadores afirman que el haplotipo en ABCB1 2677GG/3435CC se encuentra asociado a dosis más bajas de derivados cumarínicos (86, 87), corroborando así nuestra suposición de que los pacientes portadores del alelo C (que se encuentran mayor tiempo por encima de rango terapéutico) requerirán menores dosis de acenocumarol para alcanzar la estabilidad anticoagulante.

Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados, la determinación farmacogenética de VKORC1/APOE debería considerarse al inicio del tratamiento (primer mes) y VKORC1/ABCB1 para periodos más largos con el objetivo de anticipar situaciones de infra/sobreaticoagulación. El genotipo CC para VKORC1 fue capaz de predecir una mayor probabilidad de alcanzar la estabilidad anticoagulante después de siete meses de tratamiento (Tabla 5).

Variantes alélicas en CYP2C9 se han asociado previamente con mayor tiempo necesario hasta alcanzar la anticoagulación estable (104, 107, 147, 159, 160), aunque no sin controversia (98, 135), mientras que esa asociación no se ha confirmado para el polimorfismo en VKORC1 (98, 102, 104, 135, 160). En nuestros pacientes, el alelo T para VKORC1 demostró ser un potente predictor para necesitar más tiempo a la hora de alcanzar la estabilidad anticoagulante (Figura 4). Por lo tanto, este gen puede considerarse un factor importante para monitorizar más estrechamente a los pacientes que potencialmente van a requerir más tiempo hasta alcanzar la anticoagulación estable.

En nuestros pacientes, VKORC1 se asoció también a mayor presentación de INR>4 durante todo el periodo de estudio, aumentando el riesgo de sobreanticoagulación con una OR de 2.9 en los pacientes portadores del alelo T desde el primer mes hasta el final del seguimiento (Tabla 5), mientras que el efecto de CYP2C9 se pierde después de 1-2 meses de tratamiento (Figura 5B), en concordancia con resultados descritos recientemente (113). El predominio de VKORC1 sobre CYP2C9 también se ha descrito en otros estudios (48, 107, 113). Pacientes estadounidenses de origen europeo con alguna variante alélica en VKORC1 o CYP2C9 han presentado mayor riesgo de sobreanticoagulación (INR>4) durante el primer mes de tratamiento con warfarina (48, 98, 102), mientras que el genotipo TT para VKORC1 también ha mostrado un alto riesgo en la presentación de algún INR>5 (OR:4.47;p=0.03) después de 6 meses de tratamiento con warfarina (107). En nuestros pacientes, el riesgo de sobreanticoagulación estuvo aumentado también por la presencia del alelo C en ABCB1 durante todo el periodo de estudio (Figura 5C y Tabla 5). Esto representa un nuevo hallazgo que no había sido previamente investigado.

Se presentó un efecto adicional del alelo C en CYP2C9*3 en el riesgo de sobreanticoagulación severa (INR>6) durante todo el periodo de estudio, mostrando una influencia independiente del alelo C para ABCB1 en el periodo 0-7 meses. Esta implicación de CYP2C9 en el riesgo de INR>6 después de 6 meses de tratamiento con acenocumarol confirma los resultados encontrados previamente por otros autores (104, 153). Algunos estudios han descrito una influencia adicional de VKORC1, durante el primer mes de tratamiento (101, 113), que se pierde en periodos más largos (113), similar a los resultados encontrados en nuestros pacientes (Figura 6A).

El riesgo de hemorragias se ha asociado al genotipo TT para VKORC1, especialmente durante los primeros tres meses de seguimiento (Figura 7B), como se ha descrito previamente (98), pero no para CYP2C9 en ningún periodo analizado, como se confirma en muchos otros estudios (98, 102, 106, 161-163) (Tabla 5).

Uno de los principales objetivos de nuestro estudio fue evaluar la influencia de CYP2C9*2/*3, VKORC1, CYP4F2*3, ABCB1, APOE, CYP2C19*2/*17 en la seguridad del tratamiento con acenocumarol en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa con el objetivo de elucidar si alguno de estos polimorfismos pueden actuar como un factor predictivo para recomendar el uso de nuevos anticoagulantes orales en lugar de comenzar terapia de anticoagulación oral con derivados cumarínicos. Para alcanzar este objetivo, analizamos el riesgo de todos los parámetros de seguridad (tiempo dentro/fuera de rango terapéutico de INR, alcance de la estabilidad anticoagulante, sobreanticoagulación y hemorragias) en los últimos 6 meses después de comenzar tratamiento con acenocumarol, evitando el primer mes de terapia (periodo 1-7 meses).

Esta fase inicial de ajuste de dosis se ha identificado como el periodo más crítico e inestable, en el que las determinaciones fuera de rango terapéutico de INR son más frecuentes, y los pacientes son más propensos a presentar complicaciones clínicas derivadas de sobreanticoagulación (eventos hemorrágicos) o infraanticoagulación (trombosis) (27, 113).

Las hemorragias mayores (consideradas como la reacción adversa más importante en el tratamiento con derivados cumarínicos), se producen habitualmente durante las primeras semanas de tratamiento, cuando los pacientes no han alcanzado aún la dosis estable y sus controles de INR se encuentran habitualmente fuera del rango terapéutico de INR (164). Intencionadamente, hemos eliminado esta fase con el objetivo de encontrar alguna asociación de los polimorfismos genéticos analizados con la seguridad del tratamiento durante el periodo que se producen menos reacciones adversas, derivadas probablemente de la titulación de la dosis hasta alcanzar la dosis óptima, y más representativo de tratamientos de larga duración. Durante el periodo 1-7 meses, el genotipo CC para VKORC1 se asoció con un mayor alcance de la estabilidad anticoagulante (Tabla 5). Los pacientes fueron capaces de mantener el rango terapéutico durante el 61±19% del tiempo, que se considera suficiente para justificar el uso de acenocumarol como anticoagulante de elección (122). El alelo T para VKORC1 y genotipo TT para ABCB1 han mostrado influencia independiente en el tiempo por encima de rango terapéutico de INR y con INR>4 (Tabla 5). De este modo, los pacientes VKORC1-TT/ABCB1-C presentaron mayor riesgo de sobreanticoagulación y eventos hemorrágicos. Por lo tanto, los pacientes con el genotipo VKORC1-TT/ABCB1-C podrían ser candidatos para iniciar directamente tratamiento con nuevos anticoagulantes orales, evitando así las desventajas derivadas de iniciar terapia de anticoagulación oral con derivados cumarínicos.

Se observó una tendencia no significativa en los pacientes con genotipo VKORC1-TT/ABCB1-C a mantener el INR dentro del rango terapéutico durante menos tiempo (Figuras 2 y 3), dificultando de este modo el criterio de tiempo mínimo requerido para ser tan eficaz y seguro como los nuevos anticoagulantes orales (117, 118, 123). Además, los pacientes portadores del alelo T en VKORC1 mostraron menor probabilidad de alcanzar la estabilidad anticoagulante después de siete meses de seguimiento (Tabla 5), por lo que estos pacientes se encontraron más tiempo en riesgo de presentar efectos adversos, con una mayor probabilidad de mantener esta situación de forma prolongada en comparación con el resto de los pacientes.

En resumen, se debería considerar la determinación de los perfiles genéticos en VKORC1, CYP2C9*3, APOE y ABCB1 en el inicio de la terapia de anticoagulación oral con acenocumarol para identificar pacientes con mayor potencial de presentar reacciones adversas, especialmente las relacionadas con sobreanticoagulación, como son los eventos hemorrágicos.

Los perfiles farmacogenéticos pueden ser de utilidad en la identificación de pacientes en riesgo de sobreanticoagulación durante el primer mes de tratamiento (VKORC1-T/APOE-E3/E3) y para tratamiento de larga duración (VKORC1-T/ABCB1-C). El genotipo VKORC1-TT/ABCB1-C puede actuar también como un indicador de candidatos potenciales a iniciar tratamiento de anticoagulación oral de larga duración con los nuevos anticoagulantes orales en lugar de iniciar este tratamiento con derivados cumarínicos.

Se deben realizar futuros estudios que corroboren la influencia del genotipo en ABCB1 en la influencia de la respuesta a derivados cumarínicos.

6.2. PARTE II. INFLUENCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON ACENOCUMAROL. DESARROLLO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO QUE PREDICE LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL

En la terapia anticoagulante a largo plazo, la fase inicial del tratamiento con antagonistas de la vitamina K es el periodo más complicado, debido a que la dosis necesaria para alcanzar una anticoagulación estable y mantener el INR en rango terapéutico es desconocida; por lo tanto, se requieren numerosos ajustes de dosis de manera empírica (27), exponiendo a los pacientes a un mayor riesgo de tromboembolismo (INR <2) y episodios hemorrágicos (INR > 4) (124, 125). En el presente estudio, hemos investigado la influencia de los parámetros clínicos y farmacogenéticos en la variabilidad en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol con el objetivo de desarrollar un algoritmo farmacogenético (que incluye variables clínicas y genéticas) para optimizar la predicción de la dosis estable de acenocumarol en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa. El objetivo final es implementar algoritmos farmacogenéticos en la práctica clínica en pacientes que inician terapia de larga duración con acenocumarol con el fin de minimizar la duración de la primera fase de ajuste de dosis y maximizar el tiempo que permanecen los pacientes dentro del rango terapéutico de INR, reduciendo el riesgo de hemorragias y eventos tromboembólicos.

La construcción del algoritmo farmacogenético se ha derivado de 134 pacientes que se encontraban en terapia de anticoagulación oral y recibían dosis estables. Posteriormente fue probado en 30 pacientes con características similares a la cohorte de derivación. De todas las variables clínicas y genéticas probadas para la construcción del algoritmo, sólo la edad, el índice de masa corporal, la administración concomitante de amiodarona y los polimorfismos genéticos en CYP2C9 (*1/*1;*1/*2;*1/*3;*2/*2), VKORC1 (CT,TT) y APOE-rs429358 (CC) fueron incluidas en la ecuación final. La edad avanzada y la administración concomitante de amiodarona se asociaron con menor dosis de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable, y el índice de masa corporal alto se ha relacionado con mayor dosis, como se ha descrito previamente en otros algoritmos farmacogenéticos, representando sólo el 12.1% de la variabilidad total en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol (33-35, 138). La administración concomitante de estatinas u omeprazol no contribuyeron al modelo final, como se ha observado anteriormente (34, 137, 139).

Se ha descrito ampliamente en la literatura que los principales polimorfismos genéticos que se relacionan con la variabilidad en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol son VKORC1, CYP2C9 y, en menor medida, CYP4F2. De acuerdo con estos resultados, el polimorfismo genético VKORC1-rs9923231 y el haplotipo CYP2C9 fueron los más relevantes en

la predicción de la dosis estable de acenocumarol del algoritmo farmacogenético, explicando aproximadamente el 41% de la variabilidad total. Este resultado se encuentra en concordancia con otros estudios publicados anteriormente (29, 99, 101). En nuestro algoritmo, el polimorfismo genético CYP4F2 V433M (rs2108622) finalmente no fue incluido, a pesar de que previamente se ha asociado con mayor dosis (73, 74), y ha sido incluido en otros modelos farmacogenéticos (33, 34). La no influencia de CYP4F2 sobre la dosis en nuestros pacientes confirma la baja influencia de este polimorfismo genético en la dosis de acenocumarol (1-2%), como se ha descrito previamente (34, 50, 74).

La influencia de APOE con la dosis estable de acenocumarol está poco estudiado y los resultados son contradictorios (29, 33, 82, 83). En nuestros pacientes el genotipo CC para APOE-rs429358 fue capaz de explicar el 3.9% de la variabilidad total de acenocumarol en el modelo farmacogenético de regresión lineal. La dosis estable de acenocumarol fue 31.6% mayor en los pacientes con este genotipo en comparación con el resto, resultados que se encuentran en consonancia con los descritos anteriormente en pacientes anticoagulados con warfarina (83). Recientemente hemos demostrado que los pacientes APOE E3/E3, que son TT para el polimorfismo del gen APOE-rs429358, presentan un mayor riesgo de sobreanticoagulación (INR>4) durante el inicio del tratamiento de anticoagulación oral de larga duración con acenocumarol (165).

El presente estudio es el primero en añadir este polimorfismo genético en un algoritmo de dosificación de acenocumarol. El polimorfismo genético APOE-rs7412 no mostró ninguna influencia en nuestros pacientes. Esta variante alélica fue añadida en un algoritmo desarrollado en pacientes diagnosticados de enfermedad tromboembólica venosa, en el que se mostraba una tendencia no significativa a necesitar una mayor dosis estable de acenocumarol ($p=0.067$) (33). La no inclusión del polimorfismo APOE-rs429358 en dicho estudio podría ser debida a que en sus pacientes, la frecuencia alélica de este polimorfismo fue significativamente menor (1.7%) en comparación con los pacientes incluidos en el presente estudio (6.7%) (33).

La influencia del polimorfismo genético C3435T en ABCB1 en la dosis de los antagonistas de la vitamina K es controvertida (36, 86, 87). El genotipo CC se ha asociado con un menor requerimiento de dosis de antagonistas de la vitamina K (86, 87), mientras que la dosis de warfarina fue un 24% más baja en los pacientes heterocigotos para el haplotipo D en ABCB1, que incluye el polimorfismo genético C3435T (36). En nuestros pacientes, este polimorfismo genético no mostró ninguna influencia en la dosis estable de acenocumarol, y por lo tanto, no fue incluido en el modelo final. No se observó influencia significativa del polimorfismo genético

en CYP2C19 en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol, como se ha observado anteriormente (44, 87). Del mismo modo, la dosis estable no estuvo asociada a ningún polimorfismo genético en GGCX (rs12714145/rs11676382). Estas variantes alélicas se han incluido en sólo dos algoritmos farmacogenéticos que predicen dosis estables de antagonistas de la vitamina K en pacientes no caucásicos (35, 166). De acuerdo con nuestros resultados, los polimorfismos genéticos CYP4F2*3 (rs2108622), ABCB1 C3435T (rs1045642), APOE (rs7412), CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560) y GGCX (rs12714145 y rs11676382) no presentan influencia en la predicción de la dosis estable de acenocumarol y parecen no ser relevantes para la optimización de los algoritmos de que predicen la dosis estable de acenocumarol.

En los últimos cuatro años, se han desarrollado varios algoritmos que incluyen factores clínicos y genéticos con el objetivo de para mejorar la predicción de la dosis inicial de acenocumarol la dosis en la iniciación de la terapia de anticoagulación, basados en diferentes pacientes y protocolos de iniciación, obteniendo resultados similares (Tabla 10).

El algoritmo de dosificación desarrollado por el grupo de investigación EU-PACT ha sido validado externamente en 168 pacientes tratados con acenocumarol, siendo capaz de explicar el 47.3% de la variabilidad total en la dosis de mantenimiento (138). Más recientemente, se han desarrollado dos algoritmos farmacogenéticos en pacientes españoles, y ambos incluyen variaciones genéticas en VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2 (33, 34). El modelo que presenta el mayor porcentaje de variabilidad de dosis explicada (60,6%) fue desarrollado en 117 pacientes diagnosticados de enfermedad tromboembólica venosa e incluyó el polimorfismo APOE-rs7412 (33). No se ha alcanzado un mayor porcentaje de variabilidad explicada mediante algoritmos de dosificación utilizando cohortes de mayor tamaño, ya que el algoritmo desarrollado en la mayor cohorte de pacientes hasta la fecha (3656 pacientes anticoagulados con una cohorte de derivación de 973 pacientes) fue incapaz de explicar más del 50% de la variabilidad en dosis estable (34). El porcentaje de variabilidad explicada por nuestro algoritmo farmacogenético fue de 56.6% para la cohorte total de pacientes, considerándose el valor más alto alcanzado en pacientes en TAO con acenocumarol diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa (indicaciones más comunes en el TAO de larga duración con acenocumarol). A diferencia de otros estudios, se obtuvo similar capacidad predictiva del algoritmo farmacogenético en la cohorte de validación (57.3% de variabilidad explicada). Un 3.9% de variabilidad de la dosis fue explicada mediante la adición de un nuevo polimorfismo genético en APOE, pero no mediante la incorporación de otros genes potenciales candidatos que han sido poco estudiados hasta la fecha, tales como CYP2C19, ABCB1, y GGCX.

Tabla 10. Comparación de la elaboración, capacidad predictiva y relevancia clínica de los algoritmos farmacogenéticos que predicen la dosis estable de acenocumarol.

Estudio	Población	Indicación	N		R ²		Pacientes correctamente clasificados	MAE (Cohorte validación) (mg/sema)	Variables
			Modelo	Validación	Modelo	Validación			
Markatos et al.	Caucásica	FA, ETEV, RVC, OTRAS	98	-	54.3	-	-	-	Edad. CYP2C9*2/*3. VKORC1
EU-PACT	Caucásica	FA, ETEV, RVC, OTRAS	375	168	52.6%	47.3% ¹	-	3.99	.Edad.Mujer.Peso. Altura Amiodarona concomitante. CYP2C9.VKORC1
Rathore et al.	India	RVC	125 (55.5%)	100 (44.44%)	41.4%	-	-	-	Tabaco.Hombre. Edad.Peso.Altura .BSA.VKORC1.CYP2C9 CYP4F2.GGCX-rs11676382
Borobia et al.	Caucásica	ETEV	117 (79.59%)	30 (20.40%)	60.6%	38.8%	≤20%: 46.7%	3.75	Edad. IMC. Inductores e inhibidores CYP2C9. .VKORC1.CYP2C9.CYP4F2 APOE-rs7412
Wolkanin-Bartnik et al.	Caucásica	FA, ETEV, RVC	226	50	49%	-	≤25%:70%	In ≤25%: 4.4 [3.7,5.0]	Edad. IMC. Ingesta Vitamina K. Aclaramiento Creatinina <40 ml/min. VKORC1.CYP2C9
Cerezo-Manchado et al.	Caucásica	Pacientes anticoagulados	973	2683	50%	48%	≤20% <7mg/sema:≈60% 7-25mg/sema:40% >25mg/sema:≈52%	-	Edad. IMC. Área superficie corporal VKORC1.CYP2C9.CYP4F2
Presente Estudio	Caucásica	FA ETEV	134 (81.7%)	30 (18.29)	56.6%	57.3%	≤10% :40% ≤15% 53% ≤20% 67%	1.9 [0.7,3.6]	Edad.IMC. Amiodarona concomitante. VKORC1.CYP2C9.APOE-rs429358

FA: fibrilación auricular; ETEV: Enfermedad tromboembólica venosa; RVC: Reemplazo de válvula cardíaca.

La precisión del algoritmo farmacogenético fue de aproximadamente 1.5 veces mayor comparado con el modelo clínico, medida como error absoluto medio en la dosis predicha de para la cohorte de validación un 50% menor que los valores descritos en otros estudios anteriores (1.9 vs. 3.75-4.41 mg/semana) (33, 138, 139). De hecho, el 67% de los pacientes de nuestra cohorte de validación se encontraron correctamente clasificados (con desviación de $\leq 20\%$) por el algoritmo farmacogenético, en comparación con el 40-50% obtenido con otros modelos, que sólo alcanza el 60% para algunos rangos de dosis (33, 34). El porcentaje de correcta clasificación porcentaje de nuestro modelo sólo fue superado por el obtenido con un modelo farmacogenético desarrollado en una población polaca (70%), pero únicamente cuando se consideró una desviación $\leq 25\%$ de la dosis real (139).

Nuestro algoritmo farmacogenético clasificó correctamente (considerando desviación del $\leq 15\%$) al 53% de los pacientes incluidos en la cohorte de validación, es decir, 30% más que el algoritmo clínico considerando la misma desviación ($p=0.049$). Aunque este algoritmo no fue capaz de predecir la dosis correcta (desviación menor al 15%) para el 47% restante de los pacientes, casi todos (92.3%; 13/14) recibían dosis intermedias (7-21 mg/semana), cuyo riesgo puede ser considerado menor en comparación con los pacientes que requieren dosis extremas (altas/bajas). Consecuentemente, este modelo proporcionó un buen ajuste para los pacientes que requieren dosis extremas (más problemáticos). El NNG para evitar la clasificación errónea de un paciente (considerando una desviación menor al 20%) fue ≈ 6 , similar a otros algoritmos farmacogenéticos (28, 33). En resumen, nuestro modelo farmacogenético de regresión lineal demostró mayor precisión en la predicción y proporcionó una mejor clasificación correcta de pacientes que el modelo clínico. Cuando se compararon los resultados internos con los modelos farmacogenéticos publicados por otros autores (33-35, 137-139), nuestro algoritmo farmacogenético mostró mejor capacidad predictiva y relevancia clínica en la predicción de la dosis estable de acenocumarol.

Los beneficios de la implementación de los algoritmos farmacogenéticos de acenocumarol en la práctica clínica se encuentran actualmente en proceso de investigación (156, 167). Los resultados de un ensayo clínico aleatorizado de dosificación de acenocumarol guiada por genotipo (grupo EU-PACT) han encontrado que la dosis guiada por genotipo no mejoró el porcentaje de tiempo que permanecen los pacientes dentro de rango terapéutico durante las primeras 12 semanas de tratamiento (156). Además, la validación de los algoritmos farmacogenéticos en poblaciones distintas de las utilizadas originalmente para su construcción debe establecerse antes de su aplicación en diferentes entornos clínicos. El presente modelo ha sido únicamente testado en un pequeño grupo de pacientes (cohorte de validación) con

características similares a las de los pacientes utilizados para su elaboración, necesitándose un estudio posterior de validación externa. El verdadero beneficio clínico de su implementación también debe ser evaluada mediante un ensayo clínico.

En conclusión, hemos desarrollado un algoritmo farmacogenético compuesto por variables clínicas (edad, índice de masa corporal y la administración concomitante de amiodarona) y genéticas (CYP2C9, VKORC1 y APOE), que es capaz de explicar el 56.6% de la variabilidad total en el requerimiento de dosis estable de acenocumarol, el valor más alto que se ha descrito en pacientes diagnosticados de fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa, siendo capaz de clasificar correctamente al 67% de los pacientes considerando una desviación $\leq 20\%$ de la dosis estable real.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1. CONCLUSIONES INDIVIDUALES

El análisis de los resultados del presente estudio y su contraste con los publicados al respecto en la literatura científica permiten, a nuestro juicio, formular las siguientes conclusiones:

7.1.1. CONCLUSIONES PARTE I

7.1.1.1. Tiempo dentro/encima/debajo de rango terapéutico de INR

- El tiempo dentro de rango terapéutico de INR no está asociado a ninguna de las variables clínicas y genéticas analizadas en ningún periodo estudiado.
- Los pacientes de mayor edad se mantienen más tiempo por encima y menos tiempo por debajo del rango terapéutico de INR tras el primer mes y tras siete meses de tratamiento con acenocumarol.
- Los pacientes portadores del alelo T en VKORC1 y aquéllos con genotipo E3/E3 en el gen APOE se mantienen más tiempo por encima y menos tiempo por debajo del rango terapéutico de INR en comparación con el resto de los pacientes tras el primer mes de tratamiento con acenocumarol.
- Los pacientes portadores del alelo T en VKORC1 y aquéllos portadores del alelo C para ABCB1 se mantienen más tiempo por encima del rango de INR terapéutico en comparación con el resto de los pacientes tras siete meses de tratamiento con acenocumarol.

7.1.1.2. Alcance de estabilidad y tiempo hasta estabilidad

- Ningún polimorfismo genético analizado se comporta como un marcador predictivo del alcance de la estabilidad, ni del tiempo necesario hasta alcanzar dicha estabilidad tras primer mes de tratamiento.
- El genotipo CC para VKORC1 es un indicador de alcance de la estabilidad tras siete meses de tratamiento con acenocumarol.
- Los portadores del alelo T en VKORC1 necesitan más tiempo para alcanzar la estabilidad anticoagulante.
- Ningún otro polimorfismo genético comporta como un marcador predictivo del alcance de la estabilidad ni del tiempo necesario hasta alcanzar dicha estabilidad tras 7 meses de tratamiento.

7.1.1.3. Sobreanticoagulación y eventos hemorrágicos

7.1.1.3.1. INR>4

- El alelo T en VKORC1 es un indicador de mayor presentación de episodios de INR>4 en pacientes tratados con acenocumarol durante siete meses.
- Únicamente el alelo T en VKORC1 se comporta como un marcador predictivo en el riesgo de presentar algún INR>4 durante el primer mes de tratamiento.
- El genotipo TT para VKORC1 es un indicador de presentación de al menos un INR>4 en los primeros 25 días de tratamiento.
- El alelo C en CYP2C9*3 es un indicador de presentación de al menos un INR>4 antes de los primeros tres meses de tratamiento con acenocumarol.
- El alelo C para ABCB1 es un marcador predictivo en el riesgo de presentar algún INR>4 en las dos primeras semanas de tratamiento con acenocumarol.
- El alelo T para VKORC1 y el alelo C para ABCB1 se comportan como marcadores predictivos independientes en el riesgo de presentar algún INR>4 durante los siete primeros meses de tratamiento con acenocumarol.

7.1.1.3.2. INR> 6

- Ninguna variable clínica o genética analizada se comporta como marcador predictivo en el riesgo de presentar algún INR>6 durante el primer mes de tratamiento.
- El genotipo TT para VKORC1 es un indicador de riesgo de sobreanticoagulación (INR>6) antes de 17 días de tratamiento con acenocumarol.
- El alelo C en CYP2C9*3 es un indicador de riesgo de sobreanticoagulación (INR>6) durante los dos primeros meses de tratamiento.
- El género femenino y el alelo C en CYP2C9*3 o en ABCB1 se comportan como marcadores predictivos independientes de mayor riesgo de sobreanticoagulación (INR>6) durante los primeros 7 meses de tratamiento.

7.1.1.3.3. Eventos hemorrágicos

- El genotipo TT para VKORC1 es un indicador de mayor riesgo de presentar hemorragias menores en los dos primeros meses desde el inicio y después de 7 meses de tratamiento con acenocumarol.
- Ningún otro polimorfismo genético analizado se comporta como un marcador predictivo en el riesgo de hemorragia durante el primer mes de tratamiento ni tras siete meses de tratamiento.

7.1.1.4. Periodo 1-7 meses

MARCADORES FARMACOGENÉTICOS EN LA RESPUESTA A LA ANTICOAGULACIÓN ORAL

- Ninguna variable clínica ni genética analizada se comporta como un marcador predictivo del tiempo dentro de rango terapéutico de INR durante el periodo 1-7 meses.

7.1.2. CONCLUSIONES PARTE II**7.1.2.1. Influencia de las variables clínicas y genéticas con el requerimiento de dosis de acenocumarol**

- Los pacientes de mayor edad necesitan dosis más bajas de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable.
- Los pacientes con mayor IMC necesitan dosis más altas de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable.
- Los pacientes con genotipo AA para CYP2C9*3 necesitan dosis más altas de acenocumarol para alcanzar la anticoagulación estable.
- Los portadores de alguna variante alélica en CYP2C9 (cualquier combinación de *2 ó *3) requieren dosis más bajas que los pacientes *1/*1.
- Los pacientes CC para VKORC1 necesitan dosis 27.8% más altas para alcanzar la anticoagulación estable que los pacientes con genotipo CT y 61.1% más alta que los pacientes con genotipo TT para este gen.
- Los pacientes con genotipo CC en APOE (rs429358) necesitan dosis más altas de acenocumarol que el resto para alcanzar la estabilidad.

7.1.2.2. Construcción del algoritmo de dosificación de acenocumarol en base a variables clínicas y genéticas

- La edad, el IMC y la administración concomitante de simvastatina son variables independientes que presentan influencia en la predicción de la dosis estable de acenocumarol mediante el modelo clínico de regresión lineal.
- El algoritmo clínico es capaz de explicar el 14% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol.
- Las variables clínicas que presentan influencia en la predicción de la dosis estable de acenocumarol mediante el modelo farmacogenético de regresión lineal son la edad, IMC y la administración concomitante de amiodarona, siendo capaces de explicar el 12.1% de la variabilidad total en la dosis estable de acenocumarol.
- Las variables genéticas que presentan influencia en la predicción de la dosis estable de acenocumarol mediante el modelo farmacogenético de regresión lineal son: CYP2C9 (*1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2), VKORC1 (CC, CT, TT) y APOE-rs429358 (CC).

- El genotipo en VKORC1 es el que más influencia presenta en la predicción de la dosis estable, explicando el 31.5% de la variabilidad total de acenocumarol.
- El modelo farmacogenético explica el 56.6% de la variabilidad total de la dosis estable de acenocumarol.

7.1.2.3. Capacidad predictiva del modelo farmacogenético

- El algoritmo farmacogenético consigue una mejor predicción de la dosis de acenocumarol que el algoritmo clínico, mejorando la variabilidad explicada en un 42.6% en la cohorte total de pacientes.
- La precisión del algoritmo farmacogenético es aproximadamente 1.5 veces mayor comparado con el modelo clínico, medida como error absoluto medio en la dosis predicha de acenocumarol.

7.1.2.4. Relevancia clínica

- El algoritmo farmacogenético es capaz de clasificar correctamente hasta el doble de pacientes que el algoritmo clínico, considerando un 15% en la desviación de la dosis estable de acenocumarol.
- El número necesario de pacientes para genotipar con una desviación de la dosis real $\leq 20\%$ es de aproximadamente 6 pacientes.

7.2. CONCLUSIONES GENERALES

Las anteriores conclusiones individuales nos permiten formular las siguientes conclusiones generales:

7.2.1. Parte I

Evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos en la seguridad del tratamiento de anticoagulación oral con acenocumarol en pacientes diagnosticados de FA y ETEV durante los primeros 7 meses de tratamiento

Los genotipos de VKORC1 (alelo T), CYP2C9*3 (alelo C), APOE (E3/E3) y ABCB1 (alelo C) son indicadores de inseguridad en el tratamiento con acenocumarol, y deberían ser considerados para la prevención de reacciones adversas, especialmente las relacionadas con sobreanticoagulación, como hemorragias, en el inicio del tratamiento con acenocumarol. La determinación de estos perfiles farmacogenéticos podría ser útil en la identificación de pacientes en riesgo de sobreanticoagulación durante el primer mes (VKORC1-T/APOE-E3/E3) y para el tratamiento a largo plazo (VKORC1-T/ABCB1-C). El genotipo VKORC1-TT/ABCB1-C también podría actuar como un indicador de los posibles candidatos para el tratamiento con

nuevos anticoagulantes orales en lugar de inicio de terapia con los antagonistas de la vitamina K.

7.2.2. Parte II

Desarrollo de un algoritmo de dosificación individualizada de acenocumarol

El modelo farmacogenético de regresión lineal construido con las variables edad, IMC, la administración concomitante de amiodarona, CYP2C9 (*1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2), VKORC1 (CC, CT, TT) y APOE-rs429358 (CC), explica el 56.6% de la variabilidad total de la dosis estable de acenocumarol. Este modelo mejora la variabilidad explicada por el modelo clínico en un 42.6% y presenta una precisión 1.5 veces mayor en la predicción de la dosis de acenocumarol, siendo capaz de clasificar correctamente hasta el doble de pacientes que el algoritmo clínico, considerando un 15% en la desviación de la dosis estable de acenocumarol.

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

1. You JJ, Singer DE, Howard PA, Lane DA, Eckman MH, Fang MC, et al. Antithrombotic therapy for atrial fibrillation: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e531S-75S.
2. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, Prandoni P, Bounameaux H, Goldhaber SZ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e419S-94S.
3. Hirsh J. Antithrombotic therapy in deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *American heart journal*. 1992;123(4 Pt 2):1115-22.
4. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 2001;119(1 Suppl):8s-21s.
5. Daly AK, King BP. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics*. 2003;13(5):247-52.
6. Davis EM, Packard KA, Knezevich JT, Campbell JA. New and emerging anticoagulant therapy for atrial fibrillation and acute coronary syndrome. *Pharmacotherapy*. 2011;31(10):975-1016.
7. Dahl OE. New oral antithrombotics: focus on dabigatran, an oral, reversible direct thrombin inhibitor for the prevention and treatment of venous and arterial thromboembolic disorders. *Vascular health and risk management*. 2012;8:45-57.
8. Pengo V, Pegoraro C, Cucchini U, Iliceto S. Worldwide management of oral anticoagulant therapy: the ISAM study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2006;21(1):73-7.
9. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2010;31(19):2369-429.
10. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, Albers GW, Bush RL, Fagan SC, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(1):227-76.
11. Skanes AC, Healey JS, Cairns JA, Dorian P, Gillis AM, McMurtry MS, et al. Focused 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society atrial fibrillation guidelines: recommendations for stroke prevention and rate/rhythm control. *The Canadian journal of cardiology*. 2012;28(2):125-36.
12. Eitz T, Schenk S, Fritzsche D, Bairaktaris A, Wagner O, Koertke H, et al. International normalized ratio self-management lowers the risk of thromboembolic events after prosthetic heart valve replacement. *The Annals of thoracic surgery*. 2008;85(3):949-54; discussion 55.
13. Whitlock RP, Sun JC, Fremes SE, Rubens FD, Teoh KH. Antithrombotic and thrombolytic therapy for valvular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e576S-600S.
14. Choonara IA, Haynes BP, Cholerton S, Breckenridge AM, Park BK. Enantiomers of warfarin and vitamin K1 metabolism. *British journal of clinical pharmacology*. 1986;22(6):729-32.
15. Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*. 1994;4(1):39-42.

16. Zhang Z, Fasco MJ, Huang Z, Guengerich FP, Kaminsky LS. Human cytochromes P4501A1 and P4501A2: R-warfarin metabolism as a probe. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1995;23(12):1339-46.
17. Wienkers LC, Wurden CJ, Storch E, Kunze KL, Rettie AE, Trager WF. Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1996;24(5):610-4.
18. Beinema M, Brouwers JR, Schalekamp T, Wilffert B. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;100(6):1052-7.
19. Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, et al. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics*. 2008;9(9):1237-50.
20. Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2000;28(11):1284-90.
21. Alberio L. [Oral anticoagulation with vitamin K antagonists]. *Therapeutische Umschau Revue therapeutique*. 2003;60(1):5-9.
22. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clinical pharmacokinetics*. 2005;44(12):1227-46.
23. Jahnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Groth U, Martini A. The enantiomers of phenprocoumon: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1976;20(3):342-9.
24. Fasco MJ, Principe LM, Walsh WA, Friedman PA. Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry*. 1983;22(24):5655-60.
25. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*. 1990;75(9):1753-62.
26. de Boer-van den Berg MA, Thijssen HH, Vermeer C. The in vivo effects of acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin on vitamin K epoxide reductase and vitamin K-dependent carboxylase in various tissues of the rat. *Biochimica et biophysica acta*. 1986;884(1):150-7.
27. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *The New England journal of medicine*. 2008;358(10):999-1008.
28. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):753-64.
29. Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Haltmayer M, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *European journal of clinical pharmacology*. 2010;66(3):253-60.
30. 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. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;90(4):625-9.
31. Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;84(3):326-31.
32. Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood*. 2010;115(18):3827-34.

33. Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, Lorenzo A, Campos A, Munoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PloS one*. 2012;7(7):e41360.
34. Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Anton AI, Perez-Andreu V, Garcia-Barbera N, Martinez AB, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(1):146-53.
35. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PloS one*. 2012;7(5):e37844.
36. Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PK, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *The pharmacogenomics journal*. 2004;4(1):40-8.
37. Sussman N, Walterschied M, Butler T, Cali J, Riss T, Kelly J. The predictive nature of high throughput toxicity screening using a human hepatocyte cell line. *Cell Notes*. 2002;3:7-10.
38. Furuta T, Graham DY. Pharmacologic aspects of eradication therapy for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology clinics of North America*. 2010;39(3):465-80.
39. Li C, Schwarz UI, Ritchie MD, Roden DM, Stein CM, Kurnik D. Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin sensitivity during initiation of therapy. *Blood*. 2009;113(17):3925-30.
40. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *The New England journal of medicine*. 2005;352(22):2285-93.
41. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, NY)*. 1999;286(5439):487-91.
42. Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;333(2):447-58.
43. Takahashi H, Wilkinson GR, Padriani R, Echizen H. CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;75(5):376-80.
44. Thijssen HH, Verkooijen IW, Frank HL. The possession of the CYP2C9*3 allele is associated with low dose requirement of acenocoumarol. *Pharmacogenetics*. 2000;10(8):757-60.
45. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*. 1999;353(9154):717-9.
46. Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64(10):953-60.
47. Rosemary J, Adithan C. The pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance. *Current clinical pharmacology*. 2007;2(1):93-109.
48. Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, Acton RT, Beasley TM. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin response during initiation of therapy. *Blood cells, molecules & diseases*. 2009;43(1):119-28.
49. Jonas DE, McLeod HL. Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30(7):375-86.
50. Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics*. 2010;11(6):781-91.
51. Perera MA, Gamazon E, Cavallari LH, Patel SR, Poindexter S, Kittles RA, et al. The missing association: sequencing-based discovery of novel SNPs in VKORC1 and CYP2C9 that

- affect warfarin dose in African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;89(3):408-15.
52. Cavallari LH, Langae TY, Momary KM, Shapiro NL, Nutescu EA, Coty WA, et al. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2010;87(4):459-64.
53. Mitchell C, Gregersen N, Krause A. Novel CYP2C9 and VKORC1 gene variants associated with warfarin dosage variability in the South African black population. *Pharmacogenomics*. 2011;12(7):953-63.
54. 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(6974):537-41.
55. Ross KA, Bigham AW, Edwards M, Gozdzik A, Suarez-Kurtz G, Parra EJ. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *Journal of human genetics*. 2010;55(9):582-9.
56. Osman A, Enstrom C, Arbring K, Soderkvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(8):1723-9.
57. 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.
58. Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clinical pharmacokinetics*. 2008;47(9):565-94.
59. Cini M, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G, Valdre L, Frascaro M, et al. A new warfarin dosing algorithm including VKORC1 3730 G > A polymorphism: comparison with results obtained by other published algorithms. *European journal of clinical pharmacology*. 2012;68(8):1167-74.
60. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(11):2227-34.
61. Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *The pharmacogenomics journal*. 2005;5(4):262-70.
62. Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadee W. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood*. 2008;112(4):1013-21.
63. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
64. Veenstra DL, You JH, Rieder MJ, Farin FM, Wilkerson HW, Blough DK, et al. Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005;15(10):687-91.
65. Obayashi K, Nakamura K, Kawana J, Ogata H, Hanada K, Kurabayashi M, et al. VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;80(2):169-78.
66. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappe DL, Whiting BM, Kolek MJ, et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2006;22(3):191-7.
67. Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Romano S, Federici G, Novelli G. Allelic variants in the CYP2C9 and VKORC1 loci and interindividual variability in the anticoagulant dose effect of warfarin in Italians. *Pharmacogenomics*. 2007;8(11):1545-50.

68. 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. *Human genetics*. 2007;121(1):23-34.
69. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(2):101-10.
70. Momary KM, Shapiro NL, Viana MA, Nutescu EA, Helgason CM, Cavallari LH. Factors influencing warfarin dose requirements in African-Americans. *Pharmacogenomics*. 2007;8(11):1535-44.
71. Schelleman H, Chen J, Chen Z, Christie J, Newcomb CW, Brensinger CM, et al. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;84(3):332-9.
72. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Molecular pharmacology*. 2009;75(6):1337-46.
73. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008;111(8):4106-12.
74. Perez-Andreu V, Roldan V, Anton AI, Garcia-Barbera N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood*. 2009;113(20):4977-9.
75. Fava C, Montagnana M, Almgren P, Rosberg L, Lippi G, Hedblad B, et al. The V433M variant of the CYP4F2 is associated with ischemic stroke in male Swedes beyond its effect on blood pressure. *Hypertension*. 2008;52(2):373-80.
76. Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, et al. A haplotype of the CYP4F2 gene associated with myocardial infarction in Japanese men. *Molecular genetics and metabolism*. 2009;96(3):145-7.
77. Godbillon J, Richard J, Gerardin A, Meinertz T, Kasper W, Jahnchen E. Pharmacokinetics of the enantiomers of acenocoumarol in man. *British journal of clinical pharmacology*. 1981;12(5):621-9.
78. Teichert M, van Noord C, Uitterlinden AG, Hofman A, Buhre PN, De Smet PA, et al. Proton pump inhibitors and the risk of overanticoagulation during acenocoumarol maintenance treatment. *British journal of haematology*. 2011;153(3):379-85.
79. Shearer MJ. The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1997;56(3):915-37.
80. Shearer MJ. Vitamin K metabolism and nutrition. *Blood reviews*. 1992;6(2):92-104.
81. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *American journal of human genetics*. 1981;33(1):11-24.
82. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, van Duijn CM, et al. Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005;15(2):69-74.
83. 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. *The pharmacogenomics journal*. 2008;8(1):53-60.
84. Hoffmeyer S, Burk O, von 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3473-8.

85. 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. *The pharmacogenomics journal*. 2007;7(3):154-79.
86. De Oliveira Almeida VC, De Souza Ferreira AC, Ribeiro DD, Gomes Borges KB, Salles Moura Fernandes AP, Brunialti Godard AL. Association of the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and therapeutic doses of warfarin in thrombophilic patients. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(10):2120-2.
87. Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganev VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2007;32(6):641-9.
88. Wu SM, Cheung WF, Frazier D, Stafford DW. Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5038):1634-6.
89. Stafford DW. The vitamin K cycle. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1873-8.
90. King CR, Deych E, Milligan P, Eby C, Lenzini P, Grice G, et al. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104(4):750-4.
91. Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(13):2542-4.
92. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25276-83.
93. Shahin MH, Khalifa SI, Gong Y, Hammad LN, Sallam MT, El Shafey M, et al. Genetic and nongenetic factors associated with warfarin dose requirements in Egyptian patients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(3):130-5.
94. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thrombosis and haemostasis*. 2000;84(5):775-8.
95. Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;91(1):87-94.
96. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, 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.
97. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;79(4):291-302.
98. Lund K, Gaffney D, Spooner R, Etherington AM, Tansey P, Tait RC. Polymorphisms in VKORC1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates. *British journal of haematology*. 2012;158(2):256-61.
99. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*. 2005;106(1):135-40.
100. Manolopoulos VG, Ragia G, Tavidou A. Pharmacogenetics of coumarinic oral anticoagulants. *Pharmacogenomics*. 2010;11(4):493-6.
101. Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, Hofman A, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Human molecular genetics*. 2009;18(19):3758-68.

102. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*. 2009;113(4):784-92.
103. Schalekamp T, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, Conemans J, Bernsen Mj M, de Boer A. Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C9 carriers. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;75(5):394-402.
104. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, Chahid Y, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;80(1):13-22.
105. Ferder NS, Eby CS, Deych E, Harris JK, Ridker PM, Milligan PE, et al. Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during the initial weeks of therapy. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(1):95-100.
106. Visser LE, van Schaik RH, van Vliet M, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, et al. The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;92(1):61-6.
107. Meckley LM, Wittkowsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;100(2):229-39.
108. Santos PC, Dinardo CL, Schettert IT, Soares RA, Kawabata-Yoshihara L, Bensenor IM, et al. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. *European journal of clinical pharmacology*. 2013;69(4):789-97.
109. Horne BD, Lenzi PA, Wadelius M, Jorgensen AL, Kimmel SE, Ridker PM, et al. Pharmacogenetic warfarin dose refinements remain significantly influenced by genetic factors after one week of therapy. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;107(2):232-40.
110. Zhong SL, Liu Y, Yu XY, Xu D, Tan HH, Lin QX, et al. The influence of genetic polymorphisms and interacting drugs on initial response to warfarin in Chinese patients with heart valve replacement. *European journal of clinical pharmacology*. 2011;67(6):581-90.
111. Teichert M, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PA, Stricker BH, et al. Genotypes associated with reduced activity of VKORC1 and CYP2C9 and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;85(4):379-86.
112. Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, Ferrer F, Sanchez-Serrano I, Sanchez-Blanco JJ, et al. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(8):1701-6.
113. Verhoef TI, Redekop WK, Buikema MM, Schalekamp T, Van Der Meer FJ, Le Cessie S, et al. Long-term anticoagulant effects of the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in acenocoumarol users. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(4):606-14.
114. FDA. FDA approves Pradaxa to prevent stroke in people with atrial fibrillation. FDA, News & Events. 2010.
115. FDA. FDA approves Xarelto to prevent stroke in people with common type of abnormal heart rhythm. FDA, News & Events. 2011.
116. FDA. FDA approves Eliquis to reduce the risk of stroke, blood clots in patients with non-valvular atrial fibrillation. FDA, News & Events. 2012.
117. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2009;361(12):1139-51.
118. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(10):883-91.

119. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(11):981-92.
120. Larsen TB, Rasmussen LH, Skjoth F, Due KM, Callreus T, Rosenzweig M, et al. Efficacy and safety of dabigatran etexilate and warfarin in "real-world" patients with atrial fibrillation: a prospective nationwide cohort study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(22):2264-73.
121. Johnson JA. Warfarin pharmacogenetics: a rising tide for its clinical value. *Circulation*. 2012;125(16):1964-6.
122. Criterios y recomendaciones generales para el uso de nuevos anticoagulantes orales (NACO) en la prevención del ictus y la embolia sistémica en pacientes con fibrilación auricular no valvular [Internet]. 2013. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/criterios-anticoagulantes-orales.pdf>.
123. Wells G CD, Cameron C, Steiner S, Coyle K, Kelly S, Tang A, Healey J, Hsieh S, BA JvB. Safety, Effectiveness, and Cost-Effectiveness of New Oral Anticoagulants Compared with Warfarin in Preventing Stroke and Other Cardiovascular Events in Patients with Atrial Fibrillation Canada: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH); 2012 [updated April 9, 2012; cited 2013 November 7, 2013]. Available from: http://www.cadth.ca/media/pdf/NOAC_Therapeutic_Review_final_report.pdf.
124. Levine MN, Raskob G, Landefeld S, Kearon C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest*. 2001;119(1 Suppl):108s-21s.
125. Hylek EM, Go AS, Chang Y, Jensvold NG, Henault LE, Selby JV, et al. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2003;349(11):1019-26.
126. McMahan DA, Smith DM, Carey MA, Zhou XH. Risk of major hemorrhage for outpatients treated with warfarin. *Journal of general internal medicine*. 1998;13(5):311-6.
127. Oake N, Jennings A, Forster AJ, Fergusson D, Doucette S, van Walraven C. Anticoagulation intensity and outcomes among patients prescribed oral anticoagulant therapy: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2008;179(3):235-44.
128. Rose AJ, Berlowitz DR, Ash AS, Ozonoff A, Hylek EM, Goldhaber-Fiebert JD. The business case for quality improvement: oral anticoagulation for atrial fibrillation. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2011;4(4):416-24.
129. FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients. [Internet]. August 16, 2007. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm>.
130. COUMADIN® TABLETS (Warfarin sodium Tablets, USP) Crystalline COUMADIN® FOR INJECTION (Warfarin Sodium for Injection, USP) [Internet]. 2011. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/009218s108lbl.pdf.
131. Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, Berg RL, Glurich I, Burmester JK. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. *Pharmacogenetics*. 2004;14(8):539-47.
132. Kamali F, Khan TI, King BP, Frearson R, Kesteven P, Wood P, et al. Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;75(3):204-12.
133. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005;106(7):2329-33.

134. Wu AH, Wang P, Smith A, Haller C, Drake K, Linder M, et al. Dosing algorithm for warfarin using CYP2C9 and VKORC1 genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. *Pharmacogenomics*. 2008;9(2):169-78.
135. Gong IY, Tirona RG, Schwarz UI, Crown N, Dresser GK, Larue S, et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy. *Blood*. 2011;118(11):3163-71.
136. Wells PS, Majeed H, Kassem S, Langlois N, Gin B, Clermont J, et al. A regression model to predict warfarin dose from clinical variables and polymorphisms in CYP2C9, CYP4F2, and VKORC1: Derivation in a sample with predominantly a history of venous thromboembolism. *Thrombosis research*. 2010;125(6):e259-64.
137. Markatos CN, Grouzi E, Politou M, Gialeraki A, Merkouri E, Panagou I, et al. VKORC1 and CYP2C9 allelic variants influence acenocoumarol dose requirements in Greek patients. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1631-8.
138. van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJ, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *European heart journal*. 2011;32(15):1909-17.
139. Wolkanin-Bartnik J, Pogorzelska H, Szperl M, Bartnik A, Koziarek J, Bilinska ZT. Impact of genetic and clinical factors on dose requirements and quality of anticoagulation therapy in Polish patients receiving acenocoumarol: dosing calculation algorithm. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(11):611-8.
140. Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, Agarwal A, Peter I, Doheny D, et al. Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(5):1018-26.
141. Marin-Leblanc M, Perreault S, Bahroun I, Lapointe M, Mongrain I, Provost S, et al. Validation of warfarin pharmacogenetic algorithms in clinical practice. *Pharmacogenomics*. 2012;13(1):21-9.
142. Yu LP, Song HT, Zeng ZY, Wang QM, Qiu HF. [Validation and comparison of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithms in Han Chinese patients]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi*. 2012;40(7):614-9.
143. Bazan NS, Sabry NA, Rizk A, Mokhtar S, Badary O. Validation of pharmacogenetic algorithms and warfarin dosing table in Egyptian patients. *International journal of clinical pharmacy*. 2012;34(6):837-44.
144. Roper N, Storer B, Bona R, Fang M. Validation and comparison of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithms for application of pharmacogenetic testing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010;12(3):283-91.
145. van Schie RM, el Khedr N, Verhoef TI, Teichert M, Stricker BH, Hofman A, et al. Validation of the acenocoumarol EU-PACT algorithms: similar performance in the Rotterdam Study cohort as in the original study. *Pharmacogenomics*. 2012;13(11):1239-45.
146. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *American journal of epidemiology*. 2009;169(4):505-14.
147. Voora D, Eby C, Linder MW, Milligan PE, Bukaveckas BL, McLeod HL, et al. Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2C9 genotype. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;93(4):700-5.
148. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*. 2007;116(22):2563-70.
149. Wen MS, Lee M, Chen JJ, Chuang HP, Lu LS, Chen CH, et al. Prospective study of warfarin dosage requirements based on CYP2C9 and VKORC1 genotypes. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;84(1):83-9.

150. Huang SW, Chen HS, Wang XQ, Huang L, Xu DL, Hu XJ, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19(3):226-34.
151. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2010;87(5):572-8.
152. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Woller SC, Samuelson KM, Mansfield JW, et al. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II). *Circulation*. 2012;125(16):1997-2005.
153. Mark L, Marki-Zay J, Fodor L, Kondacs A, Paragh G, Katona A. [Significance of cytochrome P450 2C9 genotype for the bleeding complications in patients treated with acenocoumarol]. *Orvosi hetilap*. 2005;146(16):739-43.
154. Wallentin L, Yusuf S, Ezekowitz MD, Alings M, Flather M, Franzosi MG, et al. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *Lancet*. 2010;376(9745):975-83.
155. Gadisseur AP, van der Meer FJ, Adriaansen HJ, Fihn SD, Rosendaal FR. Therapeutic quality control of oral anticoagulant therapy comparing the short-acting acenocoumarol and the long-acting phenprocoumon. *British journal of haematology*. 2002;117(4):940-6.
156. Verhoef TI, Ragia G, de Boer A, Barallon R, Kolovou G, Kolovou V, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *The New England journal of medicine*. 2013;369(24):2304-12.
157. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;83(3):460-70.
158. Burmester JK, Berg RL, Yale SH, Rottscheit CM, Glurich IE, Schmelzer JR, et al. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011;13(6):509-18.
159. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287(13):1690-8.
160. Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, Beasley TM, McGwin G, Adler BK, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European-Americans and African-Americans. *Pharmacogenomics*. 2008;9(5):511-26.
161. Tassies D, Freire C, Pijoan J, Maragall S, Monteagudo J, Ordinas A, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica*. 2002;87(11):1185-91.
162. Montes R, Nantes O, Alonso A, Zozaya JM, Hermida J. The influence of polymorphisms of VKORC1 and CYP2C9 on major gastrointestinal bleeding risk in anticoagulated patients. *British journal of haematology*. 2008;143(5):727-33.
163. McMillin GA, Melis R, Wilson A, Strong MB, Wanner NA, Vinik RG, et al. Gene-based warfarin dosing compared with standard of care practices in an orthopedic surgery population: a prospective, parallel cohort study. *Therapeutic drug monitoring*. 2010;32(3):338-45.
164. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). *Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy*. *Lancet*. 1996;348(9025):423-8.

165. Jimenez-Varo E, Canadas-Garre M, Henriques CI, Pinheiro AM, Gutierrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernandez MA. Pharmacogenetics role in the safety of acenocoumarol therapy. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;112(3).
166. Choi JR, Kim JO, Kang DR, Yoon SA, Shin JY, Zhang X, et al. Proposal of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm in Korean patients. *Journal of human genetics*. 2011;56(4):290-5.
167. Carcas AJ, Borobia AM, Velasco M, Abad-Santos F, Diaz MQ, Fernandez-Capitan C, et al. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2012;13:239.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

9.1.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

- **Jiménez-Varo E**, Cañadas-Garre M, Henriques C, Pinheiro A, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja Hernández MA. Pharmacogenetics role in the safety of acenocoumarol therapy. Thrombosis and Haemostasis 2014. Jun 12;112(3). JCR (2012) : **6.094**, Q1
- **Jiménez-Varo E**, Cañadas-Garre M, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja Hernández MA. Prediction of stable acenocoumarol dose by a pharmacogenetic algorithm. Pharmacogenet Genomics 2014. In press. JCR (2012): **3.608**, Q1

9.1.2. CAPÍTULOS DE LIBROS

Durante la preparación de la presente Tesis Doctoral se ha publicado adicionalmente el siguiente capítulo de libro, que forma parte de la investigación desarrollada:

- **Enrique Jiménez-Varo**, Margarita Aguilera, Marisa Cañadas Garre, Desirée González Callejas, Cristina Pérez Ramírez, Miguel A. Calleja Hernández. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. In: Omics for Personalized Medicine. Editorial: Springer. Edts: Debmalya Barh, Dipali Dhawan, Nirmal Kumar Ganguly. ISBN 9788132211839.
- **Enrique Jiménez-Varo**, Cristina Pérez Ramírez, Marisa Cañadas Garre, Miguel Ángel Calleja Hernández. FARMACOGENÉTICA DE LOS ANTICOAGULANTES ORALES. En: Carolina Alarcón-Payer; Miguel Ángel Calleja Hernández; H.U VIRGEN DE LAS NIEVES. UGC Intercentros e Interniveles de Farmacia. Granada, Edts. NUEVOS AVANCES EN FARMACIA HOSPITALARIA, Ed 1. Granada: Entorno Gráfico S.L., 2014. Págs. 33-40.

9.1.3. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Durante la preparación de la presente Tesis Doctoral se han presentado las siguientes Comunicaciones a Congresos, que forman parte de la investigación desarrollada:

- **Jiménez-Varo E**, Aguilera M, Cañadas Garre M, Calleja Hernández MA. "Impact of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms on initial Anticoagulation therapy with acenocoumarol". 17th Congress of the European Hematology Association. 14-17 Jun 2012. Amsterdam, the Netherlands.
- **Jiménez-Varo E**, Aguilera M, Cañadas Garre M, Torrado González D, Calleja Hernández MA. "Influence of MDR1 C3435T gene polymorphism on anticoagulation response in the initial phase of acenocoumarol therapy". ASHP 2012 Midyear Clinical Meeting. 3-6 Dec 2012. Las Vegas, USA.
- **E. Jiménez Varo**, M. Cañadas Garre, M. Aguilera Gómez, A. Rodríguez, M.A. Calleja Hernández. "The effect of main gene polymorphisms on stable doses of acenocoumarol in long-term anticoagulation treatment". 18th EAHP Congress. 13-15 March 2013. Paris, France.
- **Jiménez-Varo, Enrique**. Cañadas Garre, Marisa. Moreno Casares, Antonia. Martínez Casanova, Nuria. Calleja Hernández, Miguel Ángel. "Frequency of CES1 (rs8192935) gene polymorphism in oral anticoagulated patients". ASHP 2013 Midyear Clinical Meeting. December 8-12, 2013. Orlando, Florida.
- **Jiménez Varo**, Cañadas Garre, Aguilera Gómez, Valero Aguilera, Calleja Hernández. "Accuracy of pharmacogenetic algorithms for the prediction of acenocoumarol stable doses in Andalusian population" 18th Congress of EHA. June 13-16, 2013. Stockholm, Sweden.
- **E Jiménez-Varo**, M Cañadas-Garre, MA Calleja Hernández. "VKORC1 in the selection of oral anticoagulant treatment for atrial fibrillation patients". 19th EAHP Congress. 26-28 March 2014. Barcelona, Spain.
- **E Jiménez-Varo**, M Cañadas-Garre, M.A Calleja Hernández. "Extrapolation of pharmacogenetic algorithms for acenocoumarol dosage in different populations". 7th Santorini Conference Biologie Prospective. 25-27 September 2014. Santorini, Greece.