

Abreviaturas

A – Adenina

AIT – Acidente Isquémico Transitório

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CYP2C9 – Citocromo P₄₅₀ 2C9

FA – Fibrilhação Auricular

G – Guanina

HTA – Hipertensão Arterial

IC – Insuficiência Cardíaca

INR – *International Normalized Ratio*

SCA – Síndrome Coronário Agudo

S-varfarina – Enantiómero S da varfarina

VKOR – Epóxido Redutase da Vitamina K

VKORC1 – Subunidade 1 do Complexo da Epóxido Redutase da Vitamina K

Resumo

Introdução: Os principais genes implicados na resposta farmacodinâmica e farmacocinética aos dicumarínicos são o gene do citocromo P₄₅₀ 2C9 (CYP2C9) e o da subunidade 1 do complexo da epóxido redutase da vitamina K (VKORC1). Os efeitos dependentes destes polimorfismos na cascata da coagulação podem contribuir para determinar a suscetibilidade individual para as diferentes doenças vasculares. Contudo, existe pouca literatura publicada sobre a eventual associação destes polimorfismos com as patologias vasculares.

Objetivos: Avaliar o impacto dos diferentes polimorfismos dos genes CYP2C9 e VKORC1 na ocorrência a médio prazo de hemorragia *major* e de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares.

População e Métodos: Análise retrospectiva de uma base de dados unicêntrica constituída por 92 doentes cronicamente anticoagulados com dicumarínicos por patologia cardíaca e, previamente submetidos a um estudo genético para os polimorfismos de suscetibilidade aos dicumarínicos (CYP2C9 e VKORC1). No grupo de doentes anticoagulados por fibrilhação auricular (FA) (n=47), foi realizado um seguimento clínico mediano de 5,8 anos para avaliar a ocorrência de hemorragia *major* e de eventos cardio e cerebrovasculares. Construiu-se um *endpoint* composto que incluiu AVC isquémico, SCA e morte e um *endpoint* AVC isquémico global correspondente à prevalência global de AVC isquémico antes do início da anticoagulação oral e durante o seguimento clínico. Para a análise dos eventos definiram-se, para o gene CYP2C9, 2 sub-grupos: CYP2C9 1/1 e CYP2C9 não 1/1, incluindo este último os doentes heterozigóticos e os homozigóticos para os alelos 2 e 3.

Resultados: Dos 92 doentes estudados, 51 (55,4%) eram do sexo masculino, sendo a idade média da população de 66 anos. A maioria dos doentes estava anticoagulada por FA (57,3%). Os genótipos mais frequentes foram o CYP2C9 1/1 e o VKORC1 G/A. Quanto ao gene

CYP2C9, a incidência de hemorragia *major*, de AVC isquêmico, do *endpoint* composto e da morte foi numericamente superior no grupo de doentes com CYP2C9 não 1/1 comparativamente com o grupo de doentes com CYP2C9 1/1, apesar de a diferença não ter atingido significância estatística. A SCA ocorreu com maior frequência no grupo de doentes CYP2C9 1/1 em relação ao grupo de doentes não 1/1, sem diferença estatisticamente significativa. Relativamente aos polimorfismos do gene VKORC1 e à ocorrência de eventos, também não se detetaram diferenças com significado estatístico. Contudo, verificou-se que a hemorragia *major* e o *endpoint* composto ocorreram com maior frequência no genótipo GG do que no GA e no AA, enquanto que a morte foi mais frequente nos heterozigóticos para o alelo A. A incidência de SCA foi numericamente superior no genótipo AA do que no GG e GA. A ocorrência de AVC hemorrágico não se verificou em nenhum dos grupos de doentes com FA. Na população total estudada e no sub-grupo de doentes com FA, os genótipos CYP2C9 não homozigóticos para o alelo *1 estiveram associados, respetivamente, a um risco 10 e 6 vezes superior de AVC isquêmico, comparativamente ao genótipo homozigótico 1/1.

Conclusão: Na população de doentes com FA estudada, não foi observada interação entre o tipo de genótipo CYP2C9 e VKORC1 e a incidência de hemorragia *major* ou dos eventos cardiovasculares e cerebrovasculares estudados. No entanto, a prevalência global de AVC isquêmico foi significativamente superior nos doentes com genótipo CYP2C9 não 1/1.

Palavras-chave: Varfarina; anticoagulação oral; farmacogenética; citocromo P450 2C9; CYP2C9; vitamina K epóxido reductase; VKORC1; hemorragia *major*; AVC isquêmico; AVC hemorrágico; SCA.

Abstract

Introduction: The key genes involved in the pharmacokinetics and pharmacodynamics response to dicumarinics are the gene of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and the subunit 1 of K vitamin's epoxide reductase complex (VKORC1). The dependent effects of these polymorphisms in the coagulation cascade can help to determine the individual susceptibility to different vascular diseases. However, there is little published literature on the possible association of these polymorphisms with vascular pathologies.

Objectives: To evaluate the impact of different polymorphisms of the CYP2C9 and VKORC1 genes in the medium term occurrence of *major* bleeding, cardiovascular and cerebrovascular events.

Methods: Retrospective analysis of a database with 92 patients chronically anticoagulated with dicumarinics for cardiac disease and previously submitted to genetic testing for polymorphisms with susceptibility to dicumarinics (CYP2C9 and VKORC1). In the group of patients anticoagulated for atrial fibrillation (AF) (n = 47), a mean clinical follow-up of 5.8 years was conducted to assess the occurrence of major bleeding and cardiovascular and cerebrovascular events. A composite endpoint that included ischemic stroke, ACS and death and another global ischemic stroke endpoint before oral anticoagulation and during follow-up were constructed. Two sub-groups: CYP2C9 1/1 and CYP2C9 non 1/1 were defined for the CYP2C9 gene allowing the analysis of the events, the latter sub-group included heterozygote and homozygote patients for the alleles 2 and 3.

Results: Of the 92 studied patients, 51 (55.4 %) were male, with a mean age of 66 years. Most of the patients were anticoagulated due to AF (57.3%). The most common genotypes were CYP2C9 1/1 and VKORC1 G/A. As for the CYP2C9 gene, the incidence of *major* bleeding, ischemic stroke, the composite endpoint and death was numerically higher in the group of

patients with CYP2C9 non 1/1 when compared with the group of patients with CYP2C9 1/1, but the differences were not statistically significant. ACS was more frequent in the group of patient with CYP2C9 1/1 without statistically significant difference. Regarding the VKORC1 polymorphisms and the occurrence of events, the differences had also no statistical significance. However, *major* bleeding and the composite endpoint occurred more frequently in the GG genotype than in the GA or AA, whereas death was more frequent in heterozygotes for the allele A. The incidence of ACS was numerically higher in AA genotype than in GG and GA. Among the entire population and in the subgroup of patients with AF, CYP2C9 non homozygous genotypes for the allele * 1 were associated with a 10 and 6 times higher risk of ischemic stroke when compared to homozygous genotype 1/1, respectively.

Conclusion: In the studied population of patients with AF, no interaction was observed between the type CYP2C9 and VKORC1 genotypes and the incidence of *major* bleeding or cardiovascular and cerebrovascular events. However, the overall prevalence of ischemic stroke was significantly higher in patients with CYP2C9 non 1/1 genotype.

Keywords: warfarin, oral anticoagulation; pharmacogenomics; cytochrome P450 2C9, CYP2C9, vitamin K epoxide reductase, VKORC1, *major* bleeding, ischemic stroke, hemorrhagic stroke, ACS.

Índice de Tabelas

Página

Tabela 1. Motivos para anticoagulação com dicumarínicos.....	14
Tabela 2. Antecedentes patológicos da população total e dos doentes com FA.....	15
Tabela 3. Prevalência dos genótipos CYP2C9 e VKORC1.....	15
Tabela 4. Eventos detetados no seguimento clínico de doentes com FA.....	16
Tabela 5. Prevalência total de AVC nos doentes com FA e na população e geral, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1.....	19

Índice de Figuras

Página

Figura 1. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA, estratificadas de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1.....	17
Figura 2. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA para o <i>endpoint</i> composto, estratificadas de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1	18
Figura 3. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA para o <i>endpoint</i> composto, estratificados de acordo com o genótipo VKORC1 AA, GA ou GG.....	18
Figura 4. Representação gráfica da prevalência de AVC nos doentes com FA, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1 ($p < 0,05$).....	20
Figura 5. Representação gráfica da prevalência de AVC na população em geral, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1 ($p < 0,05$).....	20

Índice

1. Introdução	9
2. População e Métodos	12
2.1. Eventos	12
2.2. Análise Estatística.....	13
3. Resultados	14
4. Discussão	21
5. Conclusão	25
Agradecimentos	26
Referências bibliográficas	27

Introdução

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade em Portugal¹ e, apesar de grandes avanços diagnósticos e terapêuticos, o prognóstico destas patologias continua insatisfatório.²⁻⁸ Por isso, melhorar a compreensão da patogénese destas doenças e identificar com maior precisão os indivíduos em maior risco de sofrerem eventos cardio e cerebrovasculares são objetivos da medicina personalizada.²⁻⁸

Estudos recentes na área da farmacogenética têm revelado importantes resultados quer ao nível da suscetibilidade genética para o desenvolvimento de doenças, quer na avaliação da resposta individual à terapêutica.^{2,3,7,9,10} E, apesar dos avanços na terapêutica antitrombótica, a varfarina permanece como uma das principais estratégias terapêuticas anticoagulantes, nomeadamente em grupos de alto risco, como doentes valvulares.^{4,11,12}

A evolução da compreensão da farmacodinâmica e farmacocinética e o reconhecimento da regulação genética da resposta à varfarina têm estimulado a investigação na quantificação dessa influência, tanto na segurança como na eficácia do tratamento^{6,11}, estimando-se que os fatores genéticos sejam responsáveis por 35 a 40% da variabilidade individual na resposta terapêutica à varfarina.⁸ E, embora as investigações tenham identificado a influência de vários genes, o gene que codifica o citocromo P₄₅₀ 2C9 (CYP2C9) e o gene que codifica a subunidade 1 do complexo da epóxido redutase da vitamina K (VKORC1) são os principais genes determinantes da farmacocinética e farmacodinâmica da varfarina, respetivamente.^{3,11-14}

A enzima hepática CYP2C9 é a principal responsável pelo metabolismo do enantiómero S da varfarina (S-varfarina).^{4,12} Os polimorfismos genéticos que afetam a atividade do CYP2C9 resultam numa diminuição da depuração da S-varfarina. Os indivíduos com formas que condicionam depuração mais lenta da S-varfarina são mais sensíveis ao fármaco e doses

normais tendem a causar elevações de International Normalized Ratio (INR) supra-terapêuticas, aumentando o risco hemorrágico.^{7,8,12,15} O alelo mais comum para o CYP2C9 é o *1, que se encontra associado a uma atividade enzimática normal ou aumentada e cuja frequência na população caucasiana é de 80 a 82%.⁸

Indivíduos homozigóticos para o alelo CYP2C9*1 apresentam um fenótipo considerado “metabolizador normal”.⁴ Os alelos CYP2C9 que conduzem a uma atividade enzimática reduzida ou que a inativam incluem o *2, *3, *4, *5, 6* e *11. Destes polimorfismos, o *2 e o *3 são os mais frequentes na população caucasiana, com prevalências de 8 a 13% e de 6 a 10%, respectivamente.⁸ Estes alelos são responsáveis pela redução de 40 a 75% da depuração da S-varfarina e de aproximadamente 20 a 40% da dose de varfarina necessária para obter um INR terapêutico.^{2,3}

Farmacodinamicamente, a varfarina atua por inibição da epóxido redutase da vitamina K (VKOR), que interfere com o metabolismo da vitamina K. A VKOR é codificada pelo gene VKORC1, que apresenta vários polimorfismos que afetam a sua expressão, sendo que o do promotor de VKORC1 (-1639 G>A) diminui a expressão do gene.^{8,12} A heterozigotia ou homozigotia para o alelo adenina (A) na posição 1639 diminui significativamente a expressão do VKOR, comparativamente com a homozigotia para o alelo guanina (G) nesta posição.⁸ Como esperado, o alelo A associa-se a uma maior sensibilidade à varfarina, logo os doentes portadores deste alelo requerem uma dose mais baixa comparativamente com os portadores do alelo G.^{4,8} A frequência dos homozigóticos para o alelo A é de 14 a 17% nos caucasianos, enquanto que aproximadamente 50% possuem o genótipo heterozigótico GA.³

A influência dos polimorfismos CYP2C9 e VKORC1 na resposta ao tratamento com varfarina tem sido consistentemente demonstrada em diversos estudos e ensaios clínicos aleatorizados, tendo sido desenvolvidos algoritmos de dosagem que incorporaram informações clínicas, demográficas e genéticas para ajudar a selecionar a dose inicial de varfarina.^{9,11,16-18}

Na verdade, os benefícios antitrombóticos da varfarina são prejudicados por um estreito índice terapêutico.^{6,10,19,20} A incidência de eventos hemorrágicos *major* e *minor* em doentes medicados com varfarina é 1 a 2% e 8 a 15 % superior à população geral, respectivamente.¹⁹

Comparativamente aos indivíduos homozigóticos para CYP2C9*1, indivíduos que possuem uma ou duas cópias dos alelos *2 ou *3 têm um maior risco de hemorragia^{4,14,19-21} (aproximadamente de 2,6)¹¹, ao contrário do genótipo VKORC1, que não confere um aumento significativo do risco hemorrágico.^{3,5,11,14,20} Note-se que o risco associado ao polimorfismo CYP2C9 é independente do INR encontrado no evento e persiste mesmo depois da estabilização da terapêutica anticoagulante^{5,11}, enquanto que os genótipos VKORC1 GA e AA se associam a um aumento do risco de anticoagulação excessiva nos primeiros 30 dias de terapêutica, mas não a um aumento significativo de complicações hemorrágicas.^{5,14,22}

Por outro lado, o importante papel na ativação da cascata da coagulação e na manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular, desempenhado pelas proteínas dependentes da vitamina K, faz equacionar a hipótese de que os efeitos dependentes dos genes CYP2C9 e VKORC1 na cascata da coagulação podem contribuir para determinar a suscetibilidade individual para as diferentes doenças vasculares. Contudo, existe pouca literatura publicada sobre a eventual associação destes polimorfismos com as patologias vasculares.

Pretende-se portanto, com este estudo, determinar se os polimorfismos dos genes de suscetibilidade aos dicumarínicos (CYP2C9 e VKORC1), que estão implicados na resposta terapêutica, também serão responsáveis por diferentes suscetibilidades para a ocorrência de hemorragia *major* e de eventos cardio e cerebrovasculares em doentes anticoagulados com varfarina.

População e Métodos

Conduziu-se uma análise retrospectiva de uma base de dados unicêntrica constituída por 92 doentes cronicamente anticoagulados com dicumarínicos por patologia cardíaca, previamente submetidos a um estudo genético para os polimorfismos de suscetibilidade aos dicumarínicos (polimorfismos dos genes CYP2C9 e VKORC1) durante o ano de 2009.⁸ Foi realizado um seguimento clínico destes doentes recorrendo à consulta do processo clínico e, sempre que necessário, por contacto telefónico, para avaliar a ocorrência de hemorragia *major* e de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares. O tempo mediano de seguimento clínico foi de 5,8 anos (2100 dias).

Eventos

Foram analisados os seguintes eventos: acidente vascular cerebral (AVC) isquémico, AVC hemorrágico, síndrome coronário agudo (SCA), hemorragia *major* e morte. Definiu-se hemorragia *major* como uma evidência clínica, laboratorial (queda de ≥ 3 g/dL de hemoglobina) e/ou imagiológica de hemorragia que requer uma resposta específica dos cuidados de saúde ou hemorragia fatal.²⁵ Construiu-se igualmente um *endpoint* composto que incluiu AVC isquémico, SCA e morte e um *endpoint* AVC isquémico global correspondente à prevalência global de AVC isquémico antes do início da anticoagulação oral e durante o seguimento clínico. Para a análise dos eventos definiram-se, para o gene CYP2C9, 2 sub-grupos: CYP2C9 1/1 e CYP2C9 não 1/1, incluindo este último os doentes heterozigóticos e os homozigóticos para os alelos 2 e 3.

Relativamente à associação entre os diferentes genótipos e o prognóstico optou-se por analisar apenas a população de doentes com fibrilhação auricular (FA) para garantir uma maior homogeneidade da amostra e menor variabilidade de fatores confundidores.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados em valor de média \pm desvio-padrão ou mediana (intervalo interquartil) consoante a distribuição da variável (normal ou não-normal, respetivamente). Utilizou-se o teste T de Student para comparação de variáveis contínuas com distribuição normal e o teste Qui-quadrado para variáveis categóricas. Utilizou-se análise de regressão linear para correlacionar variáveis contínuas. A análise de sobrevivência foi realizada com o método de Kaplan-Meier e comparada com o teste Log-Rank. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. Recorreu-se ao software estatístico SPSS 13.0 (Chicago, Illinois).

Resultados

Dos 92 doentes estudados, 51 (55,4%) eram do sexo masculino, com idades compreendidas entre 24 e 90 anos (média de $66,1 \pm 13,8$ anos) e peso médio de $74,5 \pm 13,9$ kg. Os doentes estavam anticoagulados em média há cerca de $5,1 \pm 6,5$ anos. A dose média de anticoagulante administrada foi de $4,5 \pm 2,6$ mg e obteve-se um INR terapêutico mediano de $2,2 \pm 1,1$. A maioria dos doentes estava anticoagulada por FA (tabela 1).

Tabela 1. Motivos para anticoagulação com dicumarínicos.

Motivos de anticoagulação	n	%
Fibrilhação auricular	47	57,3
Prótese valvular	10	12,2
Tromboembolia pulmonar	9	11,0
Hipertensão arterial pulmonar	6	7,3
Miocardiopatia dilatada	5	6,1
Doença mitral	4	4,9
Hipertensão pulmonar tromboembólica crónica	1	1,1
Total	82	100,0

Dos doentes com FA (n=47), 33 (70,2%) eram do sexo masculino, sendo a idade média de $70 \pm 10,2$ anos e o peso médio de $78,4 \pm 14,4$ kg. A duração média da anticoagulação foi de $3,4 \pm 3,1$ anos. A dose média de anticoagulante foi de $4,0 \pm 2,8$ e o INR terapêutico médio de $2,4 \pm 1,3$.

A tabela 2 mostra os antecedentes patológicos presentes quer na população total, quer nos doentes com FA.

Tabela 2. Antecedentes patológicos da população total e dos doentes com FA.

Antecedentes Patológicos	População total		Doentes com FA	
	n = 92	%	n = 47	%
IC	55	77,5	30	76,9
HTA	39	54,9	25	65,8
Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	14	19,2	5	12,8
Doença coronária	12	17,4	6	16,7
Insuficiência renal crónica	9	13,8	3	8,8
AVC/AIT	7	9,9	5	13,2
Alcoolismo	5	7,8	4	12,1
Doença hepática	4	6,2	1	2,9
Tabagismo	3	5,1	3	10,7

Em ambas as populações estudadas, os genótipos mais frequentes foram o CYP2C9 1/1 e o VKORC1 G/A. Na tabela 3 encontram-se discriminadas as prevalências dos diferentes genótipos relacionados com a sensibilidade aos anticoagulantes orais.

Tabela 3. Prevalência dos genótipos CYP2C9 e VKORC1.

Genótipos	Eventos	População total		Doentes com FA	
		n = 92	%	n = 47	%
CYP2C9	1/1	44	64,7	25	62,5
	1/2	14	20,6	9	22,5
	1/3	6	8,8	2	5,0
	2/2	2	2,9	2	5,0
	2/3	1	1,1	1	2,5
	3/3	1	1,1	1	2,5
VKORC1	GA	33	48,5	19	47,5
	GG	24	35,1	12	30,0
	AA	11	16,2	9	22,5

Para os doentes com FA, obteve-se a incidência de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares, apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Eventos detetados no seguimento clínico de doentes com FA.

Genótipo	Eventos	Hemorragia Major		AVC Isquémico		SCA		Endpoint Composto		Morte	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CYP2C9	1/1	1	4,0	2	8,0	2	8,0	12	48,0	8	32,0
	não 1/1	2	13,3	3	20,0	0	0	9	60,0	7	46,7
<i>TOTAL</i>		3	7,5	5	12,5	2	5,0	21	52,5	15	37,5
<i>P-valor</i>		0,278		0,267		0,261		0,462		0,354	
VKORC1	GG	2	16,7	2	16,7	1	8,3	7	58,3	4	33,3
	GA	1	5,3	2	10,5	0	0	9	47,4	8	42,1
	AA	0	0	1	11,1	1	11,1	5	55,6	3	33,3
<i>TOTAL</i>		3	7,5	5	12,5	2	5,0	21	52,5	15	37,5
<i>P-valor</i>		0,313		0,872		0,370		0,820		0,849	

Quanto ao gene CYP2C9, a incidência de hemorragia *major*, de AVC isquémico, do *endpoint* composto e da morte foi numericamente superior no grupo de doentes com CYP2C9 não 1/1 comparativamente com o grupo de doentes com CYP2C9 1/1 (13,3% vs. 4,0%, $p=0,278$, 20,0% vs. 8,0%, $p=0,267$, 60,0% vs. 48,0%, $p=0,462$ e 46,7% vs. 32,0%, $p=0,354$ respetivamente), apesar de a diferença não ter atingido a significância estatística. Contrariamente, a SCA ocorreu com maior frequência no grupo de doentes CYP2C9 1/1 em relação ao grupo de doentes não 1/1 (8,0% vs. 0%, $p=0,261$), não sendo, também, a diferença estatisticamente significativa.

Relativamente aos polimorfismos do gene VKORC1 e à ocorrência de eventos, também não se detetaram diferenças com significado estatístico. Contudo, verificou-se que a hemorragia *major* e o *endpoint* composto ocorreram com maior frequência no genótipo GG do que no GA e no AA (16,7% vs. 5,3% vs. 0%, $p=0,313$ e 58,3% vs. 47,4% vs. 55,6%, $p=0,820$,

respetivamente), enquanto que a morte foi mais frequente nos heterozigóticos para o alelo A (42,1% vs. 33,3% vs. 33,3%, $p=0,849$). Por outro lado, a incidência da SCA foi numericamente superior no genótipo AA do que no GG e GA (11,1% vs. 8,3% vs. 0%, $p=0,370$, respetivamente).

A ocorrência de AVC hemorrágico não se verificou em nenhum dos grupos de doentes com FA.

A figura 1 mostra que a sobrevida mediana aos 5,8 anos dos doentes com FA é menor naqueles que não são homozigóticos 1/1 para o CYP2C9 ($p=0,092$), embora esta diferença não tenha significado estatístico. A figura 2 revela que a probabilidade estimada de evoluir sem AVC isquémico, SCA ou mesmo morrer ao fim de 70 meses é 60% para os doentes com CYP2C9 1/1 e 46,7% para os doentes com CYP2C9 não 1/1 ($p=0,145$). Por sua vez, a figura 3 evidencia que a sobrevida aos 5,8 anos é inferior para os doentes homozigóticos para o alelo G do VKORC1, mostrando que a probabilidade de evoluir sem AVC isquémico, SCA ou mesmo morrer ao fim dos 5,8 anos para os polimorfismos AA, AG e GG é, respetivamente, 66,7%, 52,6% e 50% ($p=0,719$).

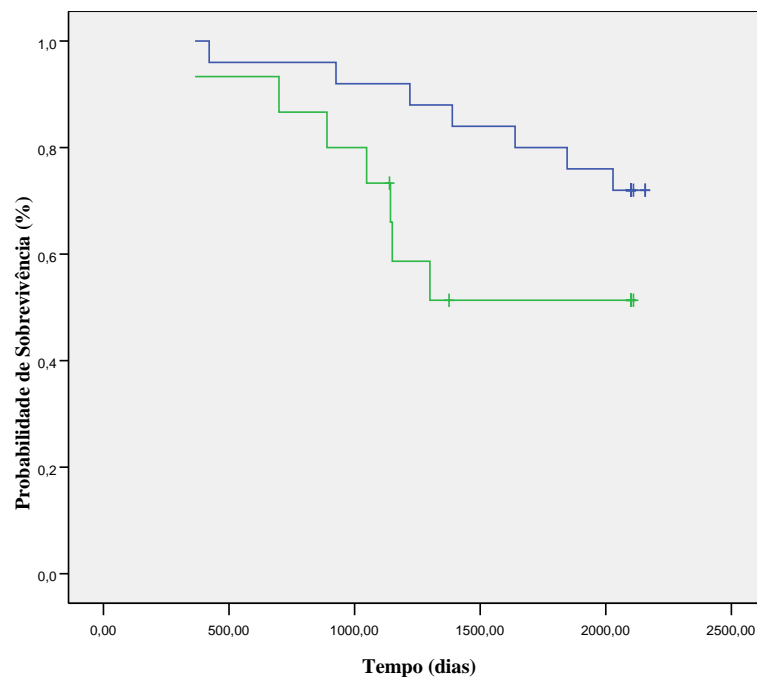


Figura 1. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA, estratificadas de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 (a azul) ou CYP2C9 não 1/1 (a verde).

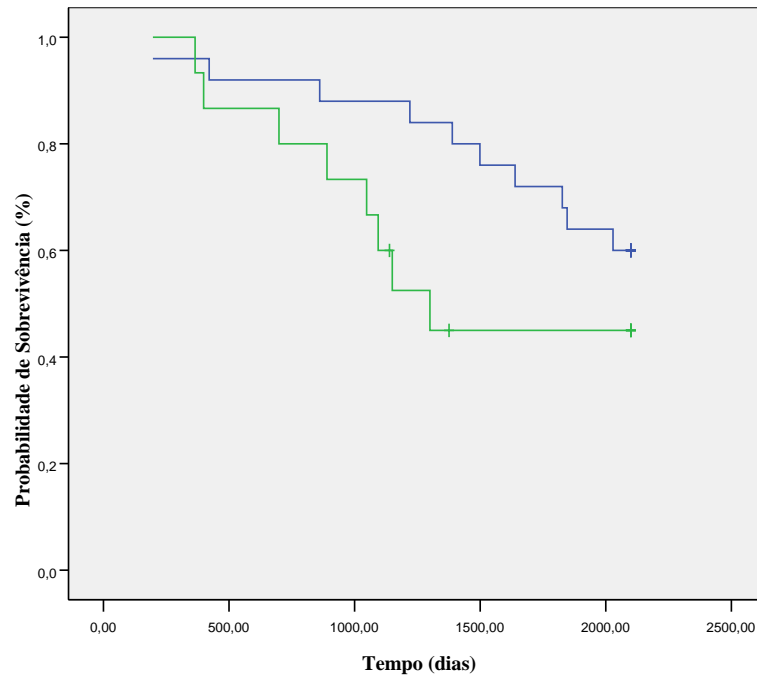


Figura 2. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA para o *endpoint* composto, estratificadas de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 (a azul) ou CYP2C9 não 1/1 (a verde).

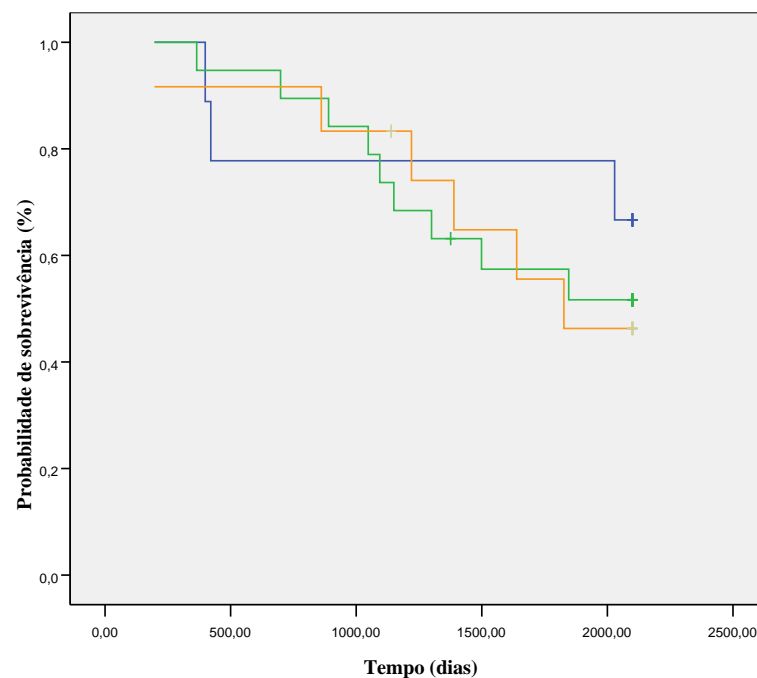


Figura 3. Representação gráfica das curvas de sobrevivência para os doentes com FA para o *endpoint* composto, estratificados de acordo com o genótipo VKORC1 AA (a azul), GA (a verde) ou GG (a laranja).

Prevalência global de AVC isquêmico

Obteve-se a prevalência global de AVC isquêmico somando a prevalência antes do início da anticoagulação oral com a incidência durante o seguimento clínico; os resultados estão representados na tabela 5.

Tabela 5. Prevalência total de AVC nos doentes com FA e na população total, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1.

Genótipo	Evento	População com FA				População total			
		Com AVC		Sem AVC		Com AVC		Sem AVC	
		n	%	n	%	n	%	n	%
CYP2C9	1/1	2	11,1	16	88,9	2	5,6	34	94,4
	não 1/1	6	46,2	7	53,8	7	38,9	11	61,1
TOTAL		8	25,8	23	74,2	9	16,7	45	83,3
<i>P-valor</i>		0,028				0,002			

A prevalência de AVC antes e durante o seguimento clínico foi significativamente superior nos doentes com genótipo CYP2C9 não 1/1 relativamente ao genótipo homozigótico para o alelo 1, tanto na população de doentes com FA (46,6% vs. 11,1%, $p=0,028$) como na população total (38,9% vs. 5,6%, $p=0,002$). As figuras 4 e 5 representam graficamente a prevalência de AVC nos doentes com FA e na população em geral, respetivamente.

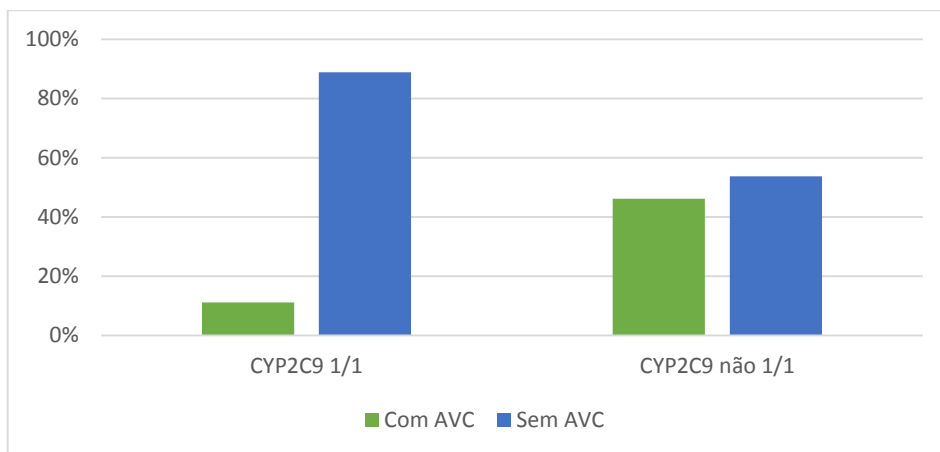


Figura 4. Representação gráfica da prevalência de AVC nos doentes com FA, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1 ($p < 0,05$).

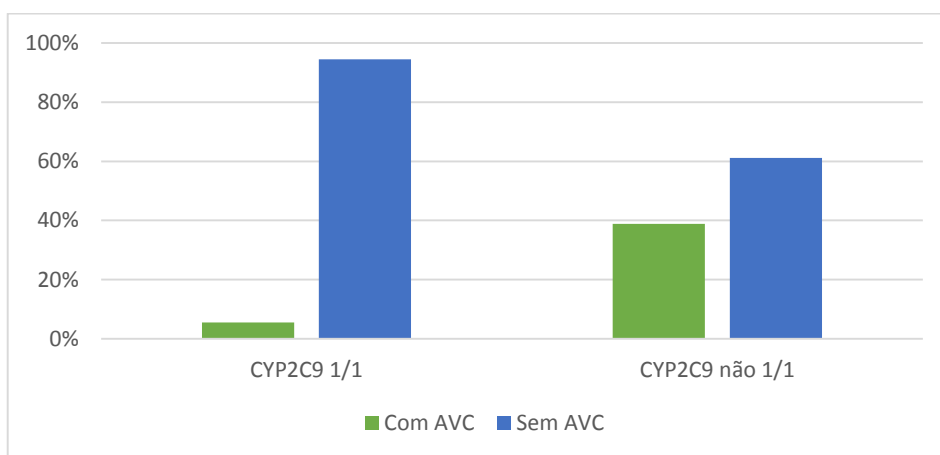


Figura 5. Representação gráfica da prevalência de AVC na população total, de acordo com o genótipo CYP2C9 1/1 ou CYP2C9 não 1/1 ($p < 0,05$).

Por último, verificou-se que na população de doentes com FA, os genótipos CYP2C9 não homozigóticos 1/1 encontram-se associados a um risco 6 vezes superior de AVC isquémico, comparativamente ao genótipo homozigótico 1/1 (*odds ratio* 6,857, $p=0,028$). Por sua vez, numa população não selecionada, os genótipos CYP2C9 não homozigóticos 1/1 estão associados a um risco 10 vezes superior de AVC isquémico, comparativamente ao genótipo homozigótico 1/1 (*odds ratio* 10,818, $p=0,002$).

Discussão

O presente estudo refere-se a uma população de doentes cronicamente anticoagulados por patologia cardíaca, maioritariamente por FA. Uma vez que a população global estudada incluía doentes anticoagulados por patologias do foro cardíaco com prognósticos intrínsecos muito distintos, para garantir uma maior homogeneidade da amostra e menor variabilidade de fatores confundidores, optou-se por limitar a análise da interação entre os diferentes polimorfismos genéticos e os eventos cardio e cerebrovasculares ao grupo de doentes anticoagulados por FA, que correspondia a 57,3% da população. Nesta população, não foi observada interação entre o tipo de genótipo CYP2C9 e VKORC1 e a incidência de hemorragia *major* ou de eventos cerebrovasculares e cardiovasculares (AVC isquémico, AVC hemorrágico, SCA e morte).

No entanto, ao relacionar a prevalência global de AVC isquémico (antes do início da anticoagulação oral e durante o seguimento clínico) com o genótipo CYP2C9 verificou-se que os doentes com genótipo CYP2C9 não 1/1 tinham uma prevalência superior deste evento, tanto na população total de doentes anticoagulados estudados, como no sub-grupo de doentes com FA.

De acordo com a evidência atual, os polimorfismos genéticos que afetam a atividade do CYP2C9 resultam numa diminuição da depuração da varfarina, aumentando a sensibilidade ao fármaco.⁸ E, comparativamente aos indivíduos homocigotos para CYP2C9*1, indivíduos que possuem uma ou duas cópias dos alelos *2 ou *3 têm um maior risco de hemorragia^{4,19,21}. Neste trabalho confirmou-se uma incidência superior de hemorragia *major* nestes doentes (13,3% vs. 4,0%, $p=0,278$), mas sem significado estatístico, possivelmente devido à reduzida dimensão da amostra.

Por sua vez, como seria de esperar, indivíduos homozigóticos para o alelo CYP2C9*1 cujo fenótipo se considera “*wild-type*”⁴ apresentam uma incidência menor (embora sem significado estatístico) de hemorragia *major*, de AVC isquêmico, do *endpoint* composto e de morte (4,0% vs. 13,3%, $p=0,313$; 8,0% vs. 20,0%, $p=0,267$; 48,0% vs. 60,0%, $p=0,462$; 32,0% vs. 46,7%, $p=0,354$; respetivamente). Assim, verificou-se numericamente que a probabilidade de evoluir livre de eventos cardio e cerebrovasculares foi superior nos doentes com CYP2C9 1/1 (60,0% vs. 46,7%, $p=0,145$). Note-se, contudo, que a incidência de SCA foi superior nestes doentes em relação aos doentes não 1/1 (8,0% vs. 0%, $p=0,261$) e que, apesar de a diferença não alcançar significância estatística (o que poderá ser devido à reduzida dimensão da amostra), traduz a necessidade de estudos de maior dimensão nesta área.

Entre a pouca literatura publicada que relaciona o gene CYP2C9 com o risco de AVC isquêmico destaca-se um trabalho austríaco que analisou e comparou as frequências dos diferentes genótipos do CYP2C9 em 389 doentes do “*Vienna Stroke Registry*” e 369 controlos saudáveis, tendo concluído que os alelos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 não representam fatores de risco para AVC isquêmico.²¹ O mesmo grupo publicou um estudo no qual reportou uma associação entre o genótipo CYP2C9 e a ocorrência de enfarte do miocárdio.²³ No entanto, o presente estudo reporta um risco 6 vezes superior de AVC isquêmico nos doentes não homozigóticos para o alelo *1, comparativamente aos portadores do genótipo homozigótico 1/1 (*odds ratio* 6,857, $p=0,028$), resultado que necessitará de confirmação em estudos prospetivos realizados em amostras de maiores dimensões.

Relativamente ao gene VKORC1, verificou-se que a frequência do genótipo AA foi de 16,2%, enquadrando-se nos valores reportados para a população caucasiana (14 a 17%).³ Dado que o alelo A determina maior sensibilidade à varfarina⁸ seria de esperar uma maior incidência de eventos hemorrágicos na heterozigotia ou homozigotia para este alelo. Contudo, a análise dos dados traduz que apesar de haver uma maior incidência de morte nos heterozigóticos para

o alelo A relativamente aos genótipos GG e GA (42,1% vs. 33,3% vs. 33,3%, $p=0,849$), a hemorragia *major* e o *endpoint* composto foram mais frequentes nos homozigóticos GG do que nos heterozigóticos GA e nos homozigóticos AA (16,7% vs. 5,3% vs. 0%, $p=0,313$ e 58,3% vs. 47,4% vs. 55,6%, $p=0,820$, respetivamente). Todavia, apesar dos indivíduos homozigóticos AA apresentarem uma maior probabilidade de evoluir sem as principais complicações: AVC isquémico, SCA ou mesmo a morte, a incidência de SCA foi numericamente superior nestes doentes comparativamente aos doentes com genótipo GG e GA (11,1% vs. 8,3% vs. 0%, $p=0,370$, respetivamente).

Na escassa literatura disponível realça-se um trabalho publicado em 2006, no qual foi estudada a associação entre os diferentes polimorfismos deste gene e a ocorrência de AVC, doença coronária e dissecção da aorta. Este estudo reportou que a prevalência do haplótipo G-C-G-C-A do VKORC1 foi significativamente mais frequente nos doentes com doença cardiovascular do que nos controlos. Verificou-se que a presença do alelo C no locus +2255 duplica o risco de doença vascular. E, apesar de permanecer desconhecida a patofisiologia desta suscetibilidade, o haplótipo poderá vir a ser um marcador genético para o risco destas doenças.²⁴ No entanto, o polimorfismo estudado no presente estudo não se mostrou associado a um aumento do número de eventos cardio e cerebrovasculares, pois apesar da prevalência de SCA ser superior nos homozigóticos AA, esta não foi estatisticamente significativa e poderá estar relacionada com a reduzida dimensão da amostra.

Estes dados refletem o impacto destes polimorfismos na suscetibilidade a eventos cardio e cerebrovasculares. O genótipo variante de CYP2C9 tanto aumenta o risco de hemorragia como de o tromboembolismo, o que poderá implicar maior dificuldade no ajuste da dose para obter o INR pretendido, tornando necessário estudos complementares nesta área.

Por sua vez, a presença do alelo A no polimorfismo VKORC1 está relacionado com uma maior sensibilidade à varfarina mas com um menor risco hemorrágico e menor ocorrência

de complicações isquêmicas, o que implica um aprofundamento no conhecimento deste polimorfismo, nomeadamente outras mutações que possam interferir nesta resposta à terapêutica.

Como limitações deste estudo, salienta-se o facto de se tratar de uma amostra pequena, pertencente a uma base de dados unicêntrica. Além disso, refere-se a uma população de anticoagulados há vários anos, maioritariamente idosos, com elevada prevalência de antecedentes patológicos que poderão, independentemente, interferir com o prognóstico. Note-se ainda que a literatura sobre esta área se encontra muito limitada sendo a maior parte das evidências resultantes de estudos observacionais, não se encontrando claramente explícita a patofisiologia de alguns achados.

São necessários estudos de maior dimensão para confirmar os resultados reportados neste trabalho.

Conclusão

Numa população de doentes com fibrilhação auricular anticoagulada com varfarina, não foi observada interação entre o tipo de genótipo CYP2C9 e VKORC1 e a incidência de hemorragia *major* ou de eventos cerebrovasculares e cardiovasculares (AVC isquémico, AVC hemorrágico, SCA e morte).

No entanto, ao relacionar a prevalência global de AVC isquémico (antes do início da anticoagulação oral e durante o seguimento clínico) com o tipo de genótipo CYP2C9 verificou-se que os doentes com genótipo CYP2C9 não 1/1 tinham uma prevalência superior deste evento, tanto na população total de doentes anticoagulados estudados, como no sub-grupo de doentes com FA.

São necessários estudos de maior dimensão para confirmar os resultados reportados neste trabalho.

Agradecimentos

À Doutora Elizabete Sofia Azenha Balhau Jorge pela oportunidade, disponibilidade e apoio, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Lino Manuel Martins Gonçalves, pela orientação deste trabalho.

Ao Doutor Rui Miguel Terenas Lança Baptista, pela disponibilidade e ajuda.

À minha família, pelo apoio incondicional e inesgotável paciência.

Aos meus Amigos, por me acompanharem em mais uma etapa.

À TFMUC, pelo incentivo e presença.

Ao e às P.

Ao meu avô.

Referências bibliográficas

1. Macedo A, Santos A, Rocha E, Perdigão C. Percepção da doença cardíaca e cerebral e dos factores de risco cardiovasculares em Portugal: Estudo AMALIA. *Rev Port Cardiol*. 2008;27(5):569–580.
2. Ong F, Deignan J, Kuo J. Clinical utility of pharmacogenetic biomarkers in cardiovascular therapeutics: a challenge for clinical implementation. *Pharmacotherapy*. 2012;13(4):465–475.
3. Cavallari LH, Shin J, Perera M a. Role of pharmacogenomics in the management of traditional and novel oral anticoagulants. *Pharmacotherapy*. 2011;31(12):1192–207.
4. Johnson J a, Gong L, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90(4):625–629.
5. Limdi N, McGwin G. Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(2):312–321.
6. Jorgensen AL, FitzGerald RJ, Oyee J, Pirmohamed M, Williamson PR. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on Patient Response to Warfarin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2012;7(8).
7. Turner R, Pirmohamed M. Cardiovascular Pharmacogenomics: Expectations and Practical Benefits. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;95(3):281–293.
8. Jorge E, Pêgo J, Baptista R. Caracterização genética da sensibilidade aos dicumarínicos numa população de doentes anticoagulados e portadores de patologia cardíaca. *Rev Port Cardiol*. 2010;(July):1831–1838.
9. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, et al. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res*. 2007;5(1):8–16.
10. Lee MT K TE. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities. *J Hum Gen*. 2013;58(6):334–338.
11. Limdi N, Veenstra D. Warfarin pharmacogenetics. *Pharmacotherapy*. 2008;28(9):1084–1097.
12. Fung E, Patsopoulos N a, Belknap SM, et al. Effect of genetic variants, especially CYP2C9 and VKORC1, on the pharmacology of warfarin. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(8):893–904.
13. Eriksson N, Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? *Pharmacogenomics*. 2012;13(4):429–440.

14. Yang J, Chen Y, Li X, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 genotypes on the risk of hemorrhagic complications in warfarin-treated patients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):4234–4243.
15. Kim SK, Yim S-V, Lee B-C. Association between cytochrome P450 promoter polymorphisms and ischemic stroke. *Exp Ther Med.* 2012;3(2):261–268.
16. Seip R, Duconge J, Rúaño G. Implementing genotype-guided antithrombotic therapy. *Future Cardiol.* 2010;6(3):409–424.
17. French B, Joo J, Geller NL, et al. Statistical design of personalized medicine interventions : The Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics (COAG) trial. *Trials.* 2010;11(1):108.
18. Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, de Boer A et al. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics.* 2009;10(10):1687–95.
19. Moyer TP, O’Kane DJ, Baudhuin LM, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(12):1079–1094.
20. Tomek A, Mat’oška V KT et al. The bleeding risk during warfarin therapy is associated with the number of variant alleles of CYP2C9 and VKORC1 genes. *Cardiology.* 2013;125(3):182–191.
21. Funk M, Freitag R, Endler G. Influence of cytochrome P450 2C9* 2 and 2C9* 3 variants on the risk of ischemic stroke: a cross-sectional case–control study. *Clin Chem.* 2005;51(9):1713–6.
22. 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. *Br J Haematol.* 2012;158(2):256–61.
23. Funk, M; Endler, G; Freitag, R; Wotja, J; Huber, K; Mannhalter C et al. CYP2C9*2 and CYP2C9*3 alleles confer a lower risk for myocardial infarction. *Clin Chem.* 2004;50(12):2395–8.
24. Wang Y, Zhang W, Zhang Y, et al. VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation.* 2006;113(12):1615–1621.
25. Mehran R, Rao S V, Bhatt DL, et al. Standardized bleeding definitions for cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Bleeding Academic Research Consortium. *Circulation.* 2011;123(23):2736–47.