



# UNIVERSIDAD DE MURCIA FACULTAD DE MEDICINA

***BÚSQUEDA DE NUEVAS VARIANTES GENÉTICAS CON  
RELEVANCIA EN LA FARMACOGENÉTICA DEL ACENOCUMAROL  
PARA LA CREACIÓN DE UN ALGORITMO CLÍNICO/GENÉTICO DE  
PREDICCIÓN DE DOSIS ESTABLE. VALORACIÓN DE SU  
APLICACIÓN EN LA DOSIFICACIÓN AL INICIO DEL TRATAMIENTO  
EN PACIENTES CON FIBRILACIÓN AURICULAR.***

Doctorando: Juan José Cerezo Manchado

Directores: Profesora Dra. Rocío González-Conejero Hilla  
Profesora Dra. Vanessa Roldán Schilling



## UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dña. ROCÍO GONZALEZ-CONJERO, Profesora Titular de la Universidad de Murcia del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA INTERNA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *“Búsqueda de nuevas variantes genéticas con relevancia en la farmacogenética del Acenocumarol para la creación de un algoritmo clínico/genético de predicción de dosis estable. Valoración de su aplicación en la dosificación al inicio del tratamiento en pacientes con fibrilación auricular”*, realizada por D. JUAN JOSE CEREZO MANCHADO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de enero de 2014



## UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dña. VANESSA ROLDÁN SCHILLING, Profesora Titular de la Universidad de Murcia del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA INTERNA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada *“Búsqueda de nuevas variantes genéticas con relevancia en la farmacogenética del Acenocumarol para la creación de un algoritmo clínico/genético de predicción de dosis estable. Valoración de su aplicación en la dosificación al inicio del tratamiento en pacientes con fibrilación auricular”*, realizada por D. JUAN JOSE CEREZO MANCHADO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de Enero de 2014

## AGRADECIMIENTOS

Una Tesis Doctoral suele realizarse durante algunos años de la vida del doctorando, llegando a ser casi una "etapa adicional" más de la vida para una persona. En mi caso ha durado algo más de 4 años. Cuando el Dr. Vicente me propuso realizarla apenas había empezado la especialidad en hematología, y aunque estaba casado, aún no había sido padre de mis dos hijos. Cuatro años después ya soy especialista y mi pequeña Celia María nació hace ya 6 meses teniendo como hermano mayor al "ya no bebe" Juan Pablo, de casi 3 años de edad. Muchas cosas han cambiado en estos 4 años y durante los mismos, yo lo he hecho más que en cualquier otra etapa de mi vida, debido a todo este conjunto de cambios. Por ello quiero agradecer a todos los que me han acompañado durante todo este tiempo, a mi mujer Toñi, por ser quien es, ya que si no, yo nunca hubiera llegado a ser como soy, pues ella me hace mejorar cada día. A mis padres por todo lo que me han dado y seguro me seguirán dando en el futuro. Al profesor Vicente Vicente por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, y por la formación académica que de ella se deriva, pues es un regalo que ya llevaré conmigo para siempre. Por supuesto a mis tutoras de Tesis, Rocío González y Vanessa Roldán, por seguir creyendo en mi todo este tiempo y tener la paciencia que el arte de enseñar requiere. A todo el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Morales Meseguer-Reina Sofía, por acompañarme estos años, y en especial a los residentes del mismo, con lo que he compartido muchas horas de amistad y formación; así como a todos los miembros del equipo de investigación del Centro Regional de Hemodonación, por a cogerme siempre como uno más del grupo. Y por último, dar las gracias a todos aquellos que de una u otra forma habéis contribuido a que esta Tesis sea una realidad.

## ABREVIATURAS

Anti-vitamina K= AVK

Antiinflamatorios no esteroideos = AINEs

APOE= Apolipoproteína E

Calumenina = CALU

Citocromo P450 2C9 = CYP2C9

Citocromo P450 4F2= CYP4F2

European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy = EU-PACT.

Gamma-glutamyl carboxylasa = GGX

Estudio de asociación del genoma = GWAS

International Normalized Ratio = INR

Nuevos anticoagulants orales = NAOs

Ácido glutámico = Glu

Ácido gamma-carboxiglutámico = Gla

Superficie corporal = SC

Terapia anticoagulante oral = TAO

Vitamin K-epóxido reductasa = VKORC1

## INDICE GENERAL

A. TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PREVIAMENTE PUBLICADOS.....	8
B. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
C. RESUMEN GLOBAL.....	30
I. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	31
II. APORTACIONES DEL DOCTORANDO.....	32
III. PRINCIPALES RESULTADOS.....	36
IV. CONCLUSIONES FINALES.....	40
D. BIBLIOGRAFIA.....	42
E. ANEXOS.....	50
ANEXO 1: ESTUDIO PILOTO.....	50
ANEXO 2: COPIA DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS.....	64

# INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## 1.INTRODUCCION

**Tabla 1.** Principales polimorfismos genéticos relacionados con la farmacogenética de Acenocumarol

**Figura 1.** Mecanismo de acción de AVK y papel de *CYP2C9*, *VKORC1* y *GGCX* en la modulación de la anticoagulación. \**CYP2C9*, citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipeptido 9;\**VKORC1*, complejo vitamina K epóxido reductasa, subunidad 1; *GGCX*,  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa

**Figura 2.** Warfarina.

**Figura 3.** Acenocumarol.

**Figura 4.** Fenprocumona.

## 2. ANEXO I

### Tablas

**Tabla 2.** Características de los pacientes

### Figuras

**Figura 3.** Diseño del estudio.

**Figura 4.** Diferencias en el porcentaje de pacientes que alcanzan el objetivo.

**Figura 5.** Mediana de días necesarios hasta alcanzar el objetivo.

**Figura 6.** Tiempo para alcanzar el objetivo durante los 6 meses de seguimiento. Análisis de Kaplan-Meier.

**Figure 7.** Mediana de días hasta alcanzar el primer INR en rango(2-3).

**Figura 8.** Media del % de INRs en rango terapéutico.

**Figura 9.** Tabla resumen de los principales resultados.

## A. TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PREVIAMENTE PUBLICADOS

La presente Tesis Doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por los Directores de Tesis y la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia, se presenta como un compendio de tres trabajos previamente publicados. Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis son las siguientes:

I. Anton AI, **Cerezo-Manchado JJ**, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, Roldan V & Gonzalez-Conejero R: *Novel associations of VKORC1 variants with higher acenocoumarol requirements*. PLoS One 2013 May 17;8(5):e64469. (JCI=3.730).

II. **Cerezo-Manchado JJ**, Roldán V, Rosafalco M, Antón AI, Arroyo AB, Garcia-Barberá N, Martínez AB, Padilla J, Corral J, Vicente V & González-Conejero R. *Effect of VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic variants in early outcomes during acenocoumarol treatment*. Pharmacogenomics 2014, in press: (JCI=3.857).

III. **Cerezo-Manchado JJ**, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martinez AB, Corral J, Vicente V, González-Conejero R, Roldán V.: *Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose*. Thromb Haemost. 2013 Jan;109(1):146-53 (JCI=6.094).

Así mismo, se considera oportuno incluir en el anexo I de la Tesis el siguiente artículo que ha constituido parte de la base formativa del doctorando y que pone en práctica los conocimientos obtenidos en los artículos anteriores que forman el cuerpo de esta Tesis, y que está actualmente en proceso de publicación:

IV. **Cerezo-Manchado JJ**, Rosafalco M, Antón AI, Padilla J, Martínez AB, Corral J, Vicente V, González-Conejero R, Roldán V, " A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Acenocoumarol in Spanish population".2014

## B. INTRODUCCION GENERAL

### I. Generalidades.

Los dicumarínicos o también llamados fármacos anti-vitamina K (AVK), son los anticoagulantes más comúnmente prescritos para la profilaxis y tratamiento de trastornos tromboembólicos venosos y arteriales (Hirsch J. 1998). En 2009, más de dos millones de pacientes iniciaron tratamiento con Warfarina en Estados Unidos resultando en más de 30 millones de prescripciones anuales (Kim M.J. 2009). En Europa tanto Femprocumona como Acenocumarol son usados ampliamente con el mismo objetivo (Al Hajje A.H. 2010). En los últimos años, la aparición comercial de nuevos anticoagulantes orales (NAOs), tales como Dabigatrán, Rivaroxabán y Apixabán, ha propiciado que el futuro de los dicumarínicos sea incierto. Estos nuevos fármacos tienen una vida media más corta y no parecen interactuar significativamente ni con otros fármacos ni con la dieta, lo que les convierte en opciones profilácticas muy prometedoras de cara al futuro en términos de efectividad. A pesar de ello, su prescripción y manejo clínico no están completamente extendidos hoy en día debido a que no están exentos de efectos secundarios graves, el encarecimiento del tratamiento (contra lo que no pueden competir respecto a los clásicos) y la dificultad de trasladar las condiciones de un ensayo clínico a la práctica diaria (Jacobson A. 2012).

Por estas razones los dicumarínicos siguen siendo los anticoagulantes orales más usados en el mundo. La principal dificultad en su manejo clínico estriba en asumir una variabilidad interindividual en la dosis necesaria para cada paciente, de tal manera que su prescripción lleva asociada el riesgo de una incorrecta dosificación del fármaco, con el correspondiente peligro de desarrollar eventos tromboembólicos (infra-dosificación) o hemorrágicos (sobre-dosificación) (Ufer M. 2005). Por tanto, en los últimos años se ha trabajado en la monitorización estrecha de la terapia anticoagulante oral (TAO) para evitar los citados efectos secundarios consiguiendo un ajuste de dosis adecuado (James A.H. 1992). En este sentido, desde la consecución de un método estandarizado de medición con la introducción del "*International Normalized Ratio*" (INR) la

monitorización del tratamiento se hizo universal, proporcionando un método uniforme y objetivo para el control de la TAO (Pengo V. 2006) .

La dosis estable de los dicumarínicos está influenciada por diferentes factores como la raza, la ingesta de vitamina K en la dieta o las comorbilidades, como son, el daño hepático, los procesos agudos, o la interacción con otros fármacos. Se estima que los factores no genéticos tales como la edad, el género, la superficie corporal (SC) y las interacciones con otros medicamentos contribuyen alrededor en un 30% de la variabilidad en la dosis de estos fármacos (Gage B.F. 2008). Sin embargo las investigaciones en esta área llevadas a cabo en los últimos años han mejorado la seguridad y la efectividad de estos fármacos (Cooper G.M. 2008). Así, estudios de farmacogenética han identificando nuevas variantes genéticas que influyen en la farmacocinética y/o farmacodinámica de los dicumarínicos. De esta forma, determinados perfiles genéticos influyen en los requerimientos de dosis, haciendo realidad la posibilidad de una medicina personalizada para la TAO. Actualmente se han realizado dos ensayos clínicos con Warfarina: Clarification of Optimal Anticoagulation Through Genetics (French B. 2010) y Genetic Informatic Trial of Warfarin Therapy (Do E.J. 2011) que buscan asegurar la eficacia y la seguridad del uso de algoritmos terapéuticos para el cálculo de una dosis personalizada. Así mismo, con acenocoumarol se realizó el ensayo del grupo europeo "*European pharmacogenetics of anticoagulant therapy*" ( EU-PACT) (van Schie R.M. 2009). Los resultados de estos ensayos han sido publicados muy recientemente (Pirmohamed M. 2013; Verhoef T.I. 2013).

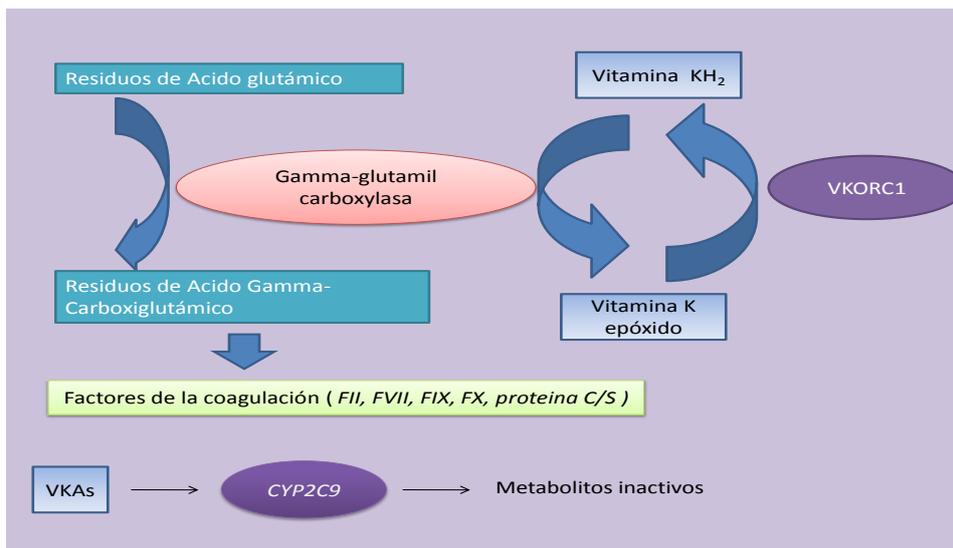
## **II. El ciclo de la vitamina K**

En 1929, el científico danés C.P. Henrik Dam investigó el papel del colesterol en la alimentación de pollos eliminándolo de su dieta. Después de varias semanas, los animales comenzaron a sangrar. La hemorragia no se pudo evitar mediante la adición de colesterol purificado a la dieta. Parecía que, junto con el colesterol, un segundo compuesto había sido eliminado de los alimentos, y a este compuesto se le llamó "vitamina de coagulación". Esta nueva vitamina, "Koagulation vitamin", fue

posteriormente bautizada con la letra K. Junto con Dam, Edward Adelbert Doisy hizo gran parte de la investigación que condujo al descubrimiento de la estructura y la naturaleza química de la vitamina K, lo que les llevó a compartir el Premio Nobel de Medicina en 1943. Pasarían cuarenta años hasta que J.T. Matschiner postulara el ciclo de interconversión entre vitamina K y vitamina K epóxido que podía ser inhibido por la Warfarina (Furie B. 1988). Es por ello que los dicumarínicos son conocidos también como fármacos anti-vitamina K ó antagonistas de vitamina K.

La vitamina K es un micronutriente esencial que participa en la modificación post-transcripcional de proteínas implicadas en la coagulación, en el metabolismo del calcio y en otros procesos fisiológicos. Cuando la vitamina K se reduce a hidroquinona, funciona de cofactor en la transformación de residuos de ácido glutámico (Glu) en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla), durante el proceso de biosíntesis de estas proteínas, llamadas dependientes de vitamina-K ó proteínas Gla. (Buitenhuis H.C. 1990) (Figura 1).

**Figura 1.** Mecanismo de acción de AVK y papel de *CYP2C9*, *VKORC1* y *GGCX* en la modulación de la anticoagulación. \**CYP2C9*, citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipeptido 9; \**VKORC1*, complejo vitamina K epóxido reductasa, subunidad 1; *GGCX*,  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa.



Los residuos Gla están implicados en la unión de calcio y son esenciales para la actividad biológica de las proteínas dependientes de vitamina K, ya que permiten la unión a fosfolípidos de membrana, donde estas proteínas ejercen su función. Hasta el momento conocemos 14 proteínas humanas con dominios Gla que juegan un papel clave en la regulación de tres procesos fisiológicos: coagulación (factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S y proteína Z); metabolismo óseo (osteocalcina, también llamada proteína-Gla ósea y proteína Gla de la matriz, MGP) y biología vascular (Growth arrest-specific 6 ó GAS6) (Cranenburg E.C. 2007; Laurance S. 2012). En ausencia de residuos Gla e incluso cuando la  $\gamma$ -carboxilación es ineficiente en alguno de los 10 ó 12 residuos posibles, la coagulación estará disminuida. Así, el objetivo final de los AVK es disminuir la cantidad de vitamina K reducida, de manera que se evita la completa  $\gamma$ -carboxilación de los factores dependientes de vitamina K. Esta es la razón por la que se utiliza vitamina K como antídoto ante la toxicidad de los fármacos AVK.

Para entender las rutas metabólicas implicadas en el ciclo de la vitamina K es crucial conocer dos complejos enzimáticos involucrados: (1)  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa (*GGCX*), último responsable de la modificación de los residuos de ácido glutámico a residuos Gla y (2) y vitamina K-epóxido reductasa (*VKORC1*), que cataliza el reciclaje de vitamina K-epóxido en vitamina K y que es inhibido de forma no competitiva por los AVK, de forma que es la diana terapéutica de estos fármacos (Rost S. 2004) (Figura 1).

**GGCX** es una proteína integral de membrana localizada en el retículo endoplasmático rugoso. Su función fue descrita primeramente por Wu *et al* en 1991 tras clonar el gen *GGCX*. Cuatro años más tarde Kuo *et al* mapearon este gen en el cromosoma 2p12. (Li T. 2004; Oldenburg J. 2008). El proceso de carboxilación empieza con la sustracción de un hidrógeno de un ácido glutámico de la proteína en cuestión. El carbanión resultante reacciona con CO<sub>2</sub>, formando así ácido glutámico  $\gamma$ -carboxilado (ácido Gla). En esta reacción, la vitamina K hidroquinona sirve como un donador de electrones y se oxida a vitamina K 2,3-epóxido. Durante este proceso, el pro-péptido se mantiene unido al centro activo de la enzima, mientras el dominio Gla sufre una translocación. A continuación, el siguiente residuo de ácido glutámico se posiciona para ser modificado y así sucesivamente, hasta que todos los dominios Gla del propéptido están

modificados. En ese momento, la afinidad por el centro activo de GGCX se reduce, liberando la proteína modificada y funcional (Stafford D.W. 2005).

El gen que codifica **VKORC1** fue identificado independiente y simultáneamente por dos laboratorios en 2004, que publicaron sus hallazgos en el mismo número de la revista Nature (Li T. 2004; Rost S. 2004).

A partir de ese momento han sido numerosas las investigaciones realizadas sobre el papel de las variaciones genéticas de VKORC1 en la respuesta anticoagulante oral (Brekenridge A.M. 1978; Palareti G. 1996). VKORC1 es un complejo enzimático localizado también en el retículo endoplásmico rugoso de hepatocitos. Es responsable de la síntesis de vitamina K hidroquinona, la cual es usada como donador de electrones para la  $\gamma$ -carboxilación de las proteínas dependientes de vitamina K por GGCX. Durante este proceso, la vitamina K hidroquinona es oxidada a vitamina K epóxido, la cual se pensó por mucho tiempo que era un producto de degradación de la vitamina K. Este ciclo permite proveer al hepatocito de suficiente vitamina K reducida para llevar a cabo la  $\gamma$ -carboxilación de las proteínas dependientes de vitamina K (García A.A. 2008). Los dicumarínicos tienen la capacidad de bloquear el centro catalítico de VKORC1 de forma no competitiva, de forma que se atenúa la actividad enzimática de esta proteína y, en consecuencia, disminuye el grado de  $\gamma$ -carboxilación de las proteínas dependientes de vitamina K.

### III. Antagonistas de vitamina K.

Como se ha mencionado previamente, la Warfarina (Figura 2) es un fármaco usado especialmente en USA y Canadá, mientras que Acenocumarol y Femprocumona son usados en muchos países europeos incluidos Holanda, Alemania y España.

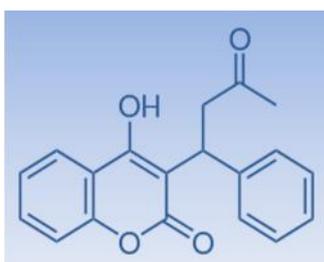


Figura 2. Warfarina

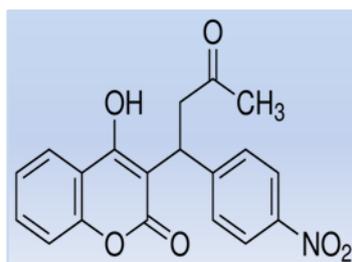


Figura3. Acenocumarol

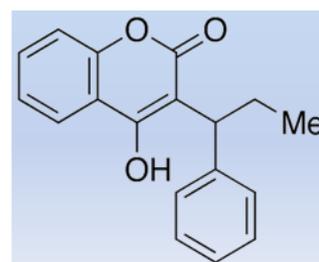


Figura 4. Femprocumona

Como se observa en las Figuras 2, 3 y 4 estos tres fármacos son 4-hidroxicumarinas. Están compuestas de un anillo aromático unido a un anillo lactónico y se comercializaron primeramente como raticidas: estos roedores lo metabolizan a 3,4-cumarin-epóxido, un componente tóxico que causa hemorragias internas y muerte (Watt B.E. 2005). En esta Tesis Doctoral hemos trabajado con pacientes anticoagulados con Acenocumarol, por lo que solamente haremos mención a esta dicumarina.

### **III.1. La importancia de la farmacogenética en la terapia con Acenocumarol.**

La genética juega un papel crucial en la respuesta de cada individuo a un fármaco. Actualmente existen evidencias científicas que sugieren que la prescripción de ciertos medicamentos teniendo en cuenta el perfil genético de cada paciente puede ayudar tanto en la seguridad como en la eficacia de los tratamientos. Tanto es así que, por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos americana ya refleja la importancia de los determinantes genéticos en el etiquetado de un número creciente de medicamentos aprobados en ese país (Frueh F.W. 2008). En concreto, este organismo ha revisado recientemente las indicaciones de prescripción de Warfarina al incluir información sobre el efecto de determinados genes en su dosificación. Además, destaca la oportunidad de utilizar pruebas genéticas para mejorar la estimación inicial de la dosis de Warfarina para los pacientes de forma individualizada. En la revisión de 2010, se proporciona una tabla con los rangos de dosis por genotipo, con la intención de disminuir el riesgo de complicaciones hemorrágicas y/o trombóticas. ([http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_coumadin.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_coumadin.pdf)). En el caso del Acenocumarol no hay todavía una recomendación de realización de pruebas genéticas previas a su prescripción por los organismos europeos correspondientes, a pesar de que también hay evidencia científica de la importancia de la farmacogenética en términos de eficacia y disminución de efectos adversos de este fármaco. De forma muy similar a lo que ocurre con Warfarina, la respuesta a Acenocumarol se ve afectada principalmente por los niveles de enzimas clave: CYP2C9, implicada en el metabolismo de los AVK y VKORC1, diana terapéutica de los dicumarínicos. El siguiente gen en importancia es CYP4F2, que influye aunque en menor medida en los requerimientos de dosis de los

AVK por un mecanismo no bien caracterizado hasta la fecha. La **Tabla 1** resume los principales polimorfismos que afectan a la dosis de mantenimiento del Acenocumarol y que han sido usados en algoritmos de dosificación hasta la fecha.

### III.2. Biodisponibilidad del Acenocumarol.

Al igual que la Warfarina, el efecto anticoagulante del Acenocumarol es influenciado por muchas interacciones fármaco-alimento y fármaco-fármaco, y se caracteriza por una variabilidad inter e intra-individual de hasta 10 veces. Del mismo modo, el papel del perfil genético de cada paciente en esta variabilidad se ha puesto de relieve en varias revisiones.

**Tabla 1.** Principales polimorfismos genéticos relacionados con la farmacogenética de Acenocumarol.

				Frecuencia (%)*			Impacto en la dosis (%)
	Variante	rs	Dosis	C	Af	As	Acenocumarol
CYP2C9	*1	Nativo	Media	81	94	98	5
	*2	rs1799853	Intermedia	13	3	0	
	*3	rs1057910	Baja	7	2	2	
VKORC1 -1639G>A	GG	Nativo	Alta	37	14	89	30
	GA	rs9923231	Intermedia	5	37	1	
	AA		Baja	58	49	10	
CYP4F2 Val433Met	VV	Nativo	Intermedia	70	93	70	2
	VM/MM	rs2108622	Alta	30	7	30	
APOE4 8016 C>T	CC	Nativo	-	92	75	87	1
	CT/ TT	rs7412	-	8	25	13	
GGCX 12970 C>G	CC	Nativo	-	86	95	100	0
	CG/GG	rs11676382	-	14	5	-	

- C: Caucasianos; Af: Africanos; As: Asiáticos

El Acenocumarol, al igual que la Warfarina, se administra como una mezcla racémica de dos enantiómeros, R- y S-Acenocumarol. El S-Acenocumarol es metabolizado por CYP2C9, mientras que CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 y CYP2C19 son las enzimas

responsables del metabolismo del R-Acenocumarol. Una diferencia importante entre la farmacocinética de Warfarina y Acenocumarol es que S- y R-Warfarina tienen una vida media de aproximadamente 32 y 43 horas, mientras que S- y R-Acenocumarol de 2 y 8 horas, respectivamente. Es por ello que el efecto anticoagulante recae principalmente sobre R-Acenocumarol.

### **III.3. Interacciones farmacológicas, medioambientales y de alimentación.**

Como cabría esperar, los medicamentos cuyo metabolismo se realiza vía CYP2C9 provocan usualmente alteraciones en las necesidades de dosis de Acenocumarol. Dado que CYP2C9 es una enzima polimórfica, la variabilidad genética juega un papel importante en la interacción potencial entre fármacos adicionales y las dicumarinas. Por ejemplo, esta enzima juega un papel clave en el metabolismo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). En pacientes anticoagulados Beinema *et al* describieron un mayor riesgo de tener INR>4.9 en portadores del alelo CYP2C9\*3 cuando se utilizaron AINEs de forma concomitante (diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno) (Beinema M. 2008).

También se han descrito otras interacciones farmacológicas con Acenocumarol: amiodarona aumenta el efecto anticoagulante en todos los pacientes que recibieron ambos fármacos (Caraco Y. 2008); la terapia concomitante con fenitoína, cotrimoxazol, las estatinas, ritonavir, miconazol o estrógenos requieren vigilancia del INR de manera más frecuente en los pacientes que toman estos medicamentos (Llibre J.M. 2002; Mondillo S. 2005; Schalekamp T. 2007; Jose L. 2008).

De una manera similar a la Warfarina, la dosis de Acenocumarol también está influenciada por factores ambientales tales como la edad, la dieta, ciertas comorbilidades, y la adhesión del paciente al tratamiento. Se ha objetivado que la dosis de Acenocumarol va disminuyendo cada década de vida, en una estimación del 11%/década (Cesar J.M. 2004).

### **III.4.Farmacogenética y Acenocumarol.**

#### **III.4.1. Polimorfismos de VKORC1 y requerimiento de dosis.**

Cronológicamente, la segunda enzima que se relacionó con la farmacogenética de dicumarinas fue VKORC1. La observación de que pacientes con el mismo genotipo CYP2C9 tenían dosis medias con una gran dispersión quedó parcialmente dilucidada con el descubrimiento del gen VKORC1. La mayor parte de los trabajos que relacionan VKORC1 y farmacogenética de dicumarinas han sido realizados en pacientes tratados con Warfarina. Como demostración, indicar que la búsqueda en PubMed en el momento de realización de esta Tesis con las claves *VKORC1/polymorphisms/Warfarina* registra 287 publicaciones, frente a las 46 entradas con el término *Acenocoumarol*.

Sin embargo, todos estos trabajos han puesto de manifiesto que VKORC1 tiene el mismo impacto en ambos anticoagulantes, por lo que la información que se presenta a continuación puede considerarse indistintamente aún cuando se refiera expresamente a Warfarina.

VKORC1 mapea en el brazo corto del cromosoma 16, conteniendo 3 exones que codifican para una proteína integral de membrana de 18 KDa. Estudios en ratas silvestres, que eran resistentes a los dicumarínicos han proporcionado importantes pistas sobre la ubicación de este componente del complejo VKORC1 (Khon M.H. 2000).

En 2005 Rieder *et al* re-secuenciaron el gen VKORC1 en casi 200 pacientes en tratamiento con Warfarina de Europa y América, e identificaron 9 haplotipos asociados con diferentes requerimientos de dosis de Warfarina (Rieder M.J. 2005). Diez polimorfismos no codificantes caracterizan a estos haplotipos, que pueden considerarse en dos grupos de acuerdo a su frecuencia en la población europea: Haplotipo A (agrupa los haplotipos H1 y H2; frecuencia=0.37) y haplotipo B (agrupa los haplotipos H7, H8 y H9; frecuencia=0.85). En los resultados de este estudio también se mostró que la distribución de los haplotipos principales difiere entre las razas. Asiático-americanos tienen una mayor proporción de haplotipos del grupo A y los

afroamericanos del grupo B. El mecanismo molecular que explicaría los diferentes requerimientos asociados a las variantes genéticas consiste en una regulación transcripcional, ya que la tasa de transcripción de la proteína es dependiente del haplotipo (Rieder M.J. 2005).

Estudios posteriores pusieron de manifiesto que el polimorfismo -1639G>A (rs9923231), un cambio en la región promotora, o el polimorfismo en el intrón 1 1173C>T (rs9934438) (ambos en fuerte desequilibrio de ligamiento, LD  $r^2 = 0,946$ ) son suficientes para predecir el efecto que el haplotipo de VKORC1 tiene en la variabilidad interindividual de dicumarinas. El alelo -1639A se asoció con niveles más bajos de ARNm de VKORC1 en hígado humano y, por lo tanto, con una dosis de mantenimiento de Warfarina reducida (Wang D. 2009).

Otros autores han demostrado una variabilidad dependiente de la raza en la dosis de mantenimiento de Warfarina en relación con el genotipo VKORC1. De este modo Takahashi *et al* mostraron diferentes contribuciones de los polimorfismos de VKORC1 y CYP2C9 a las diferencias intra- e inter-poblacional en la dosis de mantenimiento de Warfarina en japoneses, caucásicos y afroamericanos (Lee S.C. 2006).

Por último, varias mutaciones en VKORC1 (R58G, V29L, V54A o L128R) también se han descrito en contados pacientes como la causa de la resistencia farmacodinámica a la Warfarina (Harrington D.J. 2008). La mutación D36Y es común en la etnia judía de origen etíope (15%) y askenazi (4%) y se considera como un marcador de resistencia a Warfarina en pacientes de estos grupos étnicos (D'Ambrosio R.L. 2007).

En global, el genotipo de VKORC1 explica hasta el 30% en la variabilidad de dosis de Acenocumarol (Bodin L. 2005).

#### **III.4.2. Polimorfismos de CYP2C9 y requerimiento de dosis.**

El gen CYP2C9 humano se localiza en el cromosoma 10 (10q24.2), tiene aproximadamente unas 55Kb, contiene 9 exones y codifica para una proteína microsomal de 60 kDa. Se trata de un gen polimórfico y sus distintas variaciones pueden contribuir a la variabilidad interindividual en la respuesta a los AVK. El

descubrimiento de diferentes polimorfismos se llevó a cabo en una variedad de poblaciones étnicas y hoy en día, hasta treinta alelos de CYP2C9 han sido descritos (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c9.htm>).

Entre los factores genéticos, los polimorfismos de CYP2C9 fueron los primeros relacionados con la farmacogenética de dicumarínicos, en concreto con Warfarina, y su impacto clínico ha sido ampliamente estudiado. Como en el caso del VKORC1, la búsqueda en PubMed con las claves *CYP2C9/polymorphisms/Warfarina* indica 423 publicaciones frente a las 68 encontradas para Acenocumarol. En este caso, y como se indica más adelante, existen diferencias sutiles en el peso de las variantes genéticas de CYP2C9 y los requerimientos de dosis de Warfarina o Acenocumarol. En relación con la farmacogenética de ambos, tres polimorfismos de nucleótido único (SNP) han sido bien caracterizados: CYP2C9\*1, referido a la secuencia de referencia; CYP2C9\*2 (rs1799853), sustitución Arg144Cys (CGT>TGT) en el exón 3, y (ATT>CTT) cambio en el exón 7 que codifica para la variante Ile359Leu (CYP2C9\*3)(rs1057910).

Como ya se ha comentado, el aclaramiento del S-Acenocumarol es más rápido que el del R-Acenocumarol lo que explica por qué el efecto farmacológico es debido casi exclusivamente a este último (Thijssen H. H. 1985). Thijssen *et al* mostraron que la hidroxilación del S-Acenocumarol está mediada exclusivamente por CYP2C9 mientras que la hidroxilación del R-Acenocumarol es catalizada por CYP2C9 (40%-50%), CYP1A2 (20%-30%) y CYP2C19 (10%-20%) (Thijssen H. H. 2000). Aquí radica la mayor diferencia entre Warfarina y Acenocumarol, ya que el enantiómero S-Warfarina se metaboliza hasta en el 85% por CYP2C9. Teniendo en cuenta este dato, podemos anticipar que la interacción de sustratos o inhibidores de CYP2C9 será diferente en Warfarina y Acenocumarol y las variantes genéticas de CYP2C9 ejercerán un efecto diferente en la terapia de anticoagulante según el dicumarínico que se emplee. Los datos publicados en este sentido indican que la dosis de Warfarina disminuye con el número de alelos variantes de CYP2C9. Sin embargo, en el caso del Acenocumarol es el alelo CYP2C9\*3 el que tiene el mayor impacto mientras que el efecto del alelo CYP2C9\*2 es menos evidente, tanto en el aclaramiento de Acenocumarol, como en el requerimiento de dosis (Cadamuro J. 2010).

En las poblaciones caucásicas, se ha encontrado que las frecuencias alélicas son 81% (CYP2C9\*1), 12% (CYP2C9\*2), y 8% (CYP2C9\*3) (Takanashi K. 2000). La variante CYP2C9\*2 no está presente en los asiáticos y sólo 2-4% de los afroamericanos son portadores de este alelo. La variante CYP2C9\*3 está presente en el 1-4% de la población china, coreano y japonesa, y en el 1-2% de los afroamericanos (Rettie A.E. 1994). Ambas variantes, CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3, dan como resultado la reducción de la actividad enzimática en aproximadamente un 30% y 80%, respectivamente (Haining R.L. 1996). La disminución en la actividad catalítica del alelo CYP2C9\*2 se puede atribuir a su deterioro de la capacidad para interactuar con la reductasa de NADPH-CYP450 en la cascada del metabolismo oxidativo mientras que el alelo CYP2C9\*3 muestra una afinidad alterada por el sustrato (Sullivan-Klose T.H. 1996). Otros polimorfismos identificados en población japonesa (CYP2C9\*4; Arg144/Thr359) o en población afroamericana (CYP2C9\*5; Asp360Glu), son muy poco frecuentes en población caucásica e, *in vitro*, presentan deterioro notable de la actividad enzimática en comparación con variante ancestral (CYP2C9\*1), debido a alteraciones de la afinidad por el sustrato similares a la del alelo CYP2C9\*3. Un polimorfismo adicional, CYP2C9\*6, consistente en una delección del nucleótido 818 tiene como resultado un codón de parada prematuro y una proteína trunca e inactiva. Los alelos CYP2C9\*4, CYP2C9\*5 y CYP2C9\*6 se han identificado en aproximadamente el 1% de los individuos de raza negra (Ansell J. 2008).

En una consideración global, alrededor del 10% de la variabilidad en la dosis de Acenocumarol se explica por el CYP2C9 (Bodin L. 2005; Cadamuro J. 2010).

#### **III.4.3. Polimorfismos de CYP4F2 y requerimiento de dosis.**

CYP4F2 ha sido el último gen en incorporarse a la lista de responsables de la variabilidad interindividual del tratamiento con dicumarinas. Al igual que en genes anteriores, la mayor parte de la información bibliográfica se corresponde con Warfarina, aunque en global es mucho más escasa. Su importancia fue descrita en 2008 por Caldwell *et al*, quienes abordaron la búsqueda de nuevas variantes genéticas comunes relacionadas con la dosis de Warfarina mediante el empleo de un chip

comercial de genotipado de genes implicados en metabolismo de drogas (Caldwell M.D. 2008). Como resultado, el polimorfismo V433M (rs2108622) se asoció significativamente con una diferencia promedio de alrededor de 1mg/día de Warfarina entre las tres variantes en pacientes anticoagulados estables. Al año siguiente se describió su papel también en Acenocumarol (Perez-Andreu V. 2010). De manera parecida a lo descrito para las variantes de CYP2C9, el papel de CYP4F2 en la farmacogenética de dicumarinas difiere ligeramente entre Warfarina y Acenocumarol. Así, mientras que la diferencia de dosis de Warfarina es escalonada entre los tres genotipos, el alelo T sólo en homocigosis (M433M) parece aumentar significativamente la dosis de Acenocumarol en pacientes portadores de este genotipo (Caldwell M.D. 2008; Perez-Andreu V. 2010).

El papel funcional de CYP4F2 en la vía de la vitamina K no está totalmente aclarado. Es sabido que CYP4F2 hidroxila la cadena fitilo-tocoferol lateral como primer paso en la vía de la inactivación de la vitamina E y dada la similitud de la vitamina E y la cadena lateral de la vitamina K, en un primer momento se propuso que CYP4F2 hidroxile la cadena lateral de la vitamina K (Caldwell M.D. 2008). Posteriormente, Mc Donald *et al* describieron una reducción de la oxidación de la vitamina K1 y una reducción de la concentración de proteína en los portadores del alelo 433M, hallazgos que correlacionaban con una mayor dosis de Warfarina para lograr un INR estable en portadores de este alelo. Estos datos indican que CYP4F2 es una oxidasa de la vitamina K y que los portadores del alelo 433M CYP4F2 tienen una capacidad reducida para metabolizar VK1 (McDonald M.G. 2009).

Globalmente, este polimorfismo de CYP4F2 contribuye entre 2-5% de la variabilidad en la dosis de Acenocumarol.

#### **III.4.4. Otros genes y requerimiento de dosis.**

Una proporción significativa de la variabilidad interindividual en la respuesta a dicumarinas sigue siendo desconocida, por lo que no es descartable que otros genes también desempeñen un papel en sus farmacogenéticas. Entre estos genes, revisaré

brevemente los relacionados con los factores de la coagulación dependientes de vitamina K o enzimas que participan directamente en el sistema de  $\gamma$ -carboxilación.

Los datos bibliográficos acerca de polimorfismos del gen  **$\gamma$ -glutamil carboxilasa** (GGCX) y su relación con la farmacogenética de dicumarinas son escasos y contradictorios. De todos los polimorfismos conocidos de GGCX, el único con un efecto funcional demostrado hasta la fecha es rs699664 (R325Q). Este cambio da lugar a una deficiencia de  $\gamma$ -carboxilación *in vitro* (Kinoshita H. 2007). González-Conejero *et al* investigaron las consecuencias farmacogenéticas de este polimorfismo. Los resultados concluyeron que este polimorfismo no proporciona diferencias significativas en los requerimientos de dosis de Acenocumarol (Gonzalez-Conejero R. 2008).

**Calumenina** (CALU) es un interesante candidato ya que desempeña un papel esencial en el ciclo de la vitamina K. Se trata de una proteína chaperona de  $Ca^{2+}$  anteriormente descrita como un inhibidor de  $\gamma$ -carboxilación (Wajh N. 2004). González-Conejero *et al* sugirieron que el cambio 29809A>G en el extremo 3'UTR de CALU (rs699664) estaba involucrado en el tratamiento con Acenocumarol (Gonzalez- Conejero R. 2007). El hallazgo más relevante de este estudio es que los pacientes portadores de genotipos combinados CALU&VKORC1 presentaban INRs más altos al tercer día de tratamiento y requerían una menor dosis estable. Sin embargo, hasta la fecha ningún polimorfismo de CALU se ha asociado de forma inequívoca a los requerimientos de dosis de dicumarinas, porque aunque varios estudios se han publicado en este sentido, han sido descartados por otros (Vecsler M. 2006).

Otros polimorfismos que afectan a los factores de coagulación se han asociado a la farmacogenética de la Warfarina, sin que haya datos similares en el caso del Acenocumarol. D'Ambrosio *et al* describieron que polimorfismos del **Factor 2** (T165M; 20210G> A) y del **Factor 7** (-402g> A;-401G> T) afectaban a la dosis de Warfarina necesaria para alcanzar un estado de anticoagulación estable (D'Ambrosio R.L. 2004).

Estos autores hipotetizaron que la sustitución de un aminoácido polar pequeño, treonina, con uno no polar, metionina, puede inducir cambios conformacionales en la estructura tridimensional del Factor 2 interfiriendo con la afinidad por GGCX. Por su parte, el alelo -402A, responsable de mayores niveles de Factor 7 en la población

general, se ha relacionado también con aumento de las necesidades de dosis de Warfarina [73]. Sin embargo, estos hallazgos no se han confirmado por otros grupos (Herman D. 2006).

Finalmente, el gen **APOE**, apolipoproteína E, que regula la absorción de lipoproteínas por los hepatocitos, parece ser relevante para el tratamiento anticoagulante con Acenocumarol debido a que la vitamina K es transportada unida a lipoproteínas incluyendo la APOE (Shearer M.J. 2008). Sólo un estudio hasta la fecha ha descrito una asociación entre el alelo  $\epsilon 4$  y las dosis requeridas de Acenocumarol (Visser L.E. 2005) sin que otros autores hayan confirmado este resultado (Cadamuro J. 2010).

#### **III.4.5. Estudios de asociación del genoma (GWAS) en la farmacogenética del Acenocumarol.**

Los GWAS permiten una búsqueda sistemática en prácticamente todo el genoma de los factores genéticos que causan un rasgo hereditario. Este enfoque se puede utilizar en grandes muestras para identificar variantes genéticas que confieren efectos moderados en rasgos complejos cuantitativos, definidos por fenotipos homogéneos, tales como el INR y la dosis de dicumarinas. Uno de los GWAS más relevantes publicados (Takeuchi F. 2009) confirmó a VKORC1 y CYP2C9 como principales determinantes genéticos de la dosis de Warfarina en una amplia muestra de 1053 sujetos suecos. Después de un ajuste por regresión múltiple (teniendo en cuenta además la edad y el género), CYP4F2 fue identificado como un factor genético adicional que influye en los requerimientos de dosis de Warfarina.

En el caso del Acenocumarol, el único estudio de GWAS publicado hasta la fecha (Teichert M. 2009) mostró los mismos resultados que en el caso de Warfarina. De este tipo de aproximación podemos concluir que sólo tres genes (VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2) influyen en la dosis de dicumarinas con el grado de exigencia estadística propio de estudios de este tipo. A la luz de estos resultados, la identificación de otros genes relevantes aunque no totalmente descartada, requeriría la utilización de otras aproximaciones.

#### **III.4.6. Desarrollo de algoritmos de predicción de dosis de Acenocumarol.**

La aleatoriedad en la prescripción de dosis de dicumarinas que conlleva un riesgo inherente en las primeras fases del tratamiento ha propiciado que en los últimos cuatro años se esté trabajando intensamente en la elaboración de algoritmos matemáticos de predicción de dosis de estos fármacos. Este objetivo ha unido a investigadores de distintos países que con la creación de asociaciones o consorcios han desarrollado proyectos de envergadura con el objetivo de proporcionar una anticoagulación oral segura, rápida, uniforme y personalizada. Así, desde que el estudio realizado por International Warfarin Pharmacogenetics Consortium salió a la luz en el año 2009 (Klein T.E. 2009), varios algoritmos de predicción de dosis han sido publicados para las diversas dicumarinas. Este algoritmo pionero fue elaborado con datos clínicos y genéticos de 4043 pacientes y posteriormente validado en 1009 pacientes adicionales. La capacidad de predicción de dosis estable fue del 43%, con una desviación de la dosis predicha de  $\pm 20\%$  sobre la dosis terapéutica final, siendo VKORC1 el factor predictor más potente de este modelo. Posteriormente, se han llevado a cabo otros estudios con diversas aproximaciones, como son el cálculo de la dosis de carga ó de la de mantenimiento y en diferentes patologías (fibrilación auricular ó trombosis venosa) (Gong I.Y. 2011; Anderson J.L. and 2012).

En el caso del Acenocumarol, diversos países europeos se organizaron en The European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy Group (EU-PACT) para liderar esta iniciativa. El estudio EU-PACT consiste en tres ensayos de dos ramas, simple ciego, controlados y aleatorizados, en los que la dosis guiada por genotipo se compara con la administración no guiada, con una duración de seguimiento de 3 meses para cada paciente. El algoritmo de dosificación guiada por genotipos incluye además los datos clínicos y demográficos y, en la fase de seguimiento, el INR inmediatamente anterior. Los grupos control se dosifican de acuerdo con un algoritmo de dosificación no guiada por genotipos, que utiliza también el resto de los datos del algoritmo de dosificación guiada por genotipos (van Schie R.M. 2009). Los algoritmos de este estudio fueron desarrollados con un total de 624 pacientes que utilizaron Femprocumona y 471 pacientes con Acenocumarol (van Schie R.M. 2011). En el algoritmo de dosificación

guiada por genotipos se llegó a una capacidad de predicción del 47%, mientras que en de dosificación no guiada por genotipos, del 17%. Ambos algoritmos fueron validados en cohortes independientes, 229 pacientes anticoagulados con Femprocumona y 168 con Acenocumarol (Schalekamp T. 2007).

Otros algoritmos para Acenocumarol se han desarrollado posteriormente. El primero de ellos fue publicado en 2010 por Verde Z. *et al* (Verde Z. 2010), diseñado a partir de datos de 193 pacientes con anticoagulación estable. En 2012, Borobia *et al* (Borobia A.M. 2012) compararon un algoritmo farmacogenético con otro clínico en 147 pacientes, siendo muy superior el primero (con una capacidad de predicción del 61% vs 22%, respectivamente). En este estudio se incluyen por vez primera las variantes genéticas de CYP4F2 (rs2108622) y APOE, añadiendo un 3.6 % y un 1.3 % en el modelo de regresión, respectivamente.

#### **III.4.7 Otras consecuencias relevantes de la terapia anticoagulante oral predichas por la farmacogenética.**

La contribución relativa de los genotipos de VKORC1 y CYP2C9 durante el inicio de la terapia con Acenocumarol a otras consecuencias importantes derivadas del tratamiento para el control clínico de los pacientes, fue documentada primeramente en un estudio realizado en el año 2009 por el grupo de Rotterdam (Teichert M. 2009). En este estudio, se describe cómo el riesgo de tener un INR alto con las primeras dosis prescritas aumentó con el tipo y el número de alelos variantes de VKORC1 y CYP2C9. Además, el riesgo de  $INR \geq 6$  tras la dosis inicial estándar aumentó significativamente con el número de alelos T de VKORC1.

La relación entre sobredosificación al inicio de la terapia y genotipos de VKORC1 y CYP2C9 ha sido abordada en varios estudios, aunque los datos resultantes son contradictorios ya que la interacción descrita entre ambos genes por algunos autores no es confirmada por otros (Ufer M. 2005; Meckley L.M. 2008; Spreafico M. 2008; Teichert M. 2009). Sobre la influencia del polimorfismo de CYP4F2 en la sobredosificación no hay datos hasta la fecha, por lo que ha sido objeto de estudio de

esta Tesis Doctoral, como se puede ver en la publicación en *Pharmacogenomics* que se adjunta en la sección de trabajos resultantes de la presente Tesis.

#### IV. Presentación de los trabajos y unidad científica de la tesis

Como se ha podido constatar en la introducción general, el proyecto de la presente Tesis se ha basado en la observación del interés de la creación de un algoritmo de predicción de dosis para el tratamiento anticoagulante oral con Acenocumarol y su posterior comparación con el método de dosificación tradicional. La innovación en este sentido es doble, ya que por una parte era conveniente validar un algoritmo en una población mayor a las actualmente descritas (van Schie R.M. 2011) y por otra que se ajustara a las necesidades poblacionales de nuestro entorno. Las variables tanto demográficas como genéticas que se manejan a la hora de elaborar estos algoritmos son específicas de la población en las que el algoritmo se ha desarrollado, por lo que cada algoritmo de predicción de dosis se ajustará específicamente a la población en la que ha sido diseñado.

Con este planteamiento, elaboramos el proyecto de Tesis Doctoral fundamentado en **tres objetivos básicos** interrelacionados, que han dado lugar a tres publicaciones. Las dos primeras (en la secuencia del proyecto pero no en la fecha de publicación) aportan los pilares sobre los que se fundamenta el objetivo final, la elaboración de un algoritmo clínico/genético de predicción de dosis, que ha quedado recogido en una tercera publicación (cronológicamente la primera en ser aceptada para publicación). Así, el **primer objetivo** de este proyecto ha sido publicado en PLoS One (JCI=3.730): *Novel associations of VKORC1 variants with higher acenocoumarol requirements* (Anton AI, Cerezo-Manchado JJ, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, Roldan V & Gonzalez-Conejero R; PLoS One 2013 May 17; 8(5):e64469). Como queda recogido en este artículo, pretendimos caracterizar nuevas variantes genéticas que pudieran aportar valor predictivo en el caso de pacientes con requerimientos de Acenocumarol extremos, que son alrededor de un 5% de nuestra población. El interés radicaba en valorar si estas nuevas variantes debían o no ser incluidas en un futuro algoritmo de predicción de dosis.

Con el **segundo objetivo**, tratamos de evaluar el impacto de las principales variantes genéticas implicadas en la farmacogenética del Acenocumarol en los parámetros

clínicos más relevantes al inicio de la terapia. Este objetivo ha sido publicado en *Pharmacogenomics* (JCI=3.857): *Effect of VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic variants in early outcomes during acenocoumarol treatment* (JJ Cerezo-Manchado, V Roldán, M Rosafalco, AI Antón, AB Arroyo, N Garcia-Barberá, AB Martínez, J Padilla, J Corral, V Vicente & R González-Conejero; *Pharmacogenomics* 2014, in press).

Finalmente, los objetivos previos se consolidan en el **tercer objetivo**, la creación de un algoritmo de predicción de dosis de Acenocoumarol teniendo en cuenta factores clínicos y genéticos, publicado en *Thrombosis and Haemostasis* (JCI=6.094): *Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose* (Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martinez AB, Corral J, Vicente V, González-Conejero R, Roldán V; *Thromb Haemost.* 2013 Jan; 109(1):146-53).

Para la elaboración de este algoritmo contamos con el asesoramiento de la empresa Instrumentation Laboratory S.p.A. (IZASA), con quien hemos mantenido un contrato de colaboración durante tres años.

En la **última sección** de esta Tesis presentaremos la última parte del trabajo en este proyecto, que actualmente se encuentra en preparación para publicación. Una vez elaborado el algoritmo pusimos en marcha un ensayo piloto para la validación del mismo en un grupo de pacientes que iniciaban el tratamiento con Acenocoumarol. La descripción completa del mismo, así como los resultados obtenidos se detallan en el Anexo I de esta Tesis Doctoral.

## **C. RESUMEN GLOBAL DE LA INVESTIGACION**

## **I. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

En base a lo expuesto en la Introducción, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es la identificación de factores genéticos y/o adquiridos que tengan influencia en la dosis estable de la terapia con Acenocumarol, así como su importancia al inicio de la misma, a la hora de calcular una dosis personalizada para cada paciente. Se pretende así disminuir el riesgo de sobre- ó infradosificación inherente al sistema tradicional de dosificación por ensayo/error. Este objetivo fundamental se desgrena en cuatro objetivos principales, tres de ellos forman el cuerpo de esta Tesis Doctoral y el último se incluye en el Anexo I de la misma al estar en proceso de publicación:

1-Tratar de caracterizar nuevas variantes génicas en VKORC1, el principal determinante de la dosis de Acenocumarol, que estuvieran relacionadas con requerimientos extremos y que pudieran ser incluidas en un algoritmo de predicción de dosis.

2- Estudiar la influencia de los polimorfismos de VKORC1 (rs9923231) CYP2C9 (rs1799853 y rs1057910) y CYP4F2 (rs2108622) en el riesgo de sobredosificación, expresado como tiempo hasta el primer INR>4, y en tiempo hasta alcanzar la dosis estable durante los 3 primeros meses de anticoagulación, con el fin de estudiar si estos polimorfismos pudieran tener un papel en la mejora de la seguridad al inicio de la terapia anticoagulante oral.

3- Creación de un algoritmo de predicción de dosis para la terapia anticoagulante con Acenocumarol que combine variables clínicas y genéticas con el fin de que los pacientes alcancen en menor tiempo la dosis estable y se reduzcan los riesgos de sangrado y trombosis.

4-Comparación de la eficacia y seguridad de dos métodos de dosificación de Acenocumarol en pacientes con fibrilación auricular: dosificación habitual según el criterio del facultativo vs dosificación guiada por un algoritmo basado en el genotipo de los pacientes.

## **II. APORTACIONES DEL DOCTORANDO Y DATOS PERSONALES DE LOS AUTORES Y LAS REVISTAS.**

La contribución del doctorando para cada objetivo de la presente Tesis Doctoral se describe a continuación:

**1er OBJETIVO:** Caracterización de nuevas variantes génicas en VKORC1 relacionadas con requerimientos de Acenocumarol extremos que pudieran ser incluidas en un algoritmo de predicción de dosis.

Este objetivo ha sido desarrollado en el siguiente artículo:

Anton AI, **Cerezo-Manchado JJ**, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, Roldan V & Gonzalez-Conejero R. *Novel associations of VKORC1 variants with higher acenocoumarol requirements*. PLoS One 2013 May 17; 8(5):e64469 (JCI=3.730).

El doctorando ha participado recogiendo los datos clínicos necesarios para el estudio, bien mediante la revisión de historias clínicas (tanto en formato digital como en soporte físico) o mediante entrevistas telefónicas con los pacientes en caso de dudas o información incompleta. Además, contribuyó a la interpretación de los resultados generados y a la discusión intelectual, así como a la escritura del artículo.

**2º OBJETIVO:** Estudiar la influencia de los polimorfismos de VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2 en el riesgo de sobredosificación y en tiempo hasta alcanzar la dosis estable durante los 3 primeros meses de anticoagulación, con el fin de estudiar si estos polimorfismos pudieran tener un papel en la mejora de la seguridad al inicio de la terapia oral anticoagulante. Este objetivo ha sido recogido en el siguiente artículo:

**Cerezo-Manchado JJ**, Roldán V, Rosafalco M, Antón AI, Arroyo AB, Garcia-Barberá N, Martínez AB, Padilla J, Corral J, Vicente V & González-Conejero R. *Effect of VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic variants in early outcomes during acenocoumarol treatment*. Pharmacogenomics 2014, in press (JCI=3.857).

El doctorando ha participado recogiendo los datos clínicos y las muestras biológicas necesarias para el estudio. Además, realizó el análisis estadístico, y participó en la interpretación de los resultados generados, así como en la escritura del artículo.

**3er OBJETIVO:** Creación de un algoritmo de predicción de dosis para la terapia anticoagulante con Acenocoumarol que combine variables clínicas y variables genéticas con el fin de que los paciente alcancen en menor tiempo la dosis estable y se reduzcan los riesgos inherentes, sangrado y trombosis, al inicio de la terapia oral anticoagulante. Este objetivo ha sido desarrollado en el siguiente artículo:

**Cerezo-Manchado JJ**, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martinez AB, Corral J, Vicente V, González-Conejero R, Roldán V. *Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose*. Thromb Haemost. 2013 Jan; 109(1):146-53 (JCI=6.094).

El doctorando ha trabajado tanto en la recogida de datos como en el análisis estadístico al inicio del mismo. Además ha colaborado con el resto de autores en la elaboración y redacción del artículo así como en los resultados y conclusiones finales que de él se derivan y en las posteriores revisiones.

**4er OBJETIVO (Anexo I):** Comparación de la eficacia y seguridad de dos métodos de dosificación de Acenocoumarol en pacientes con fibrilación auricular: El doctorando ha trabajado en la recogida de datos durante el ensayo, incluyendo las entrevistas personales a los pacientes y el seguimiento de todos ellos de forma personalizada. Además ha participado en el análisis estadístico de los datos del estudio, así como en su interpretación. Está actualmente colaborando en la escritura de un próximo artículo con el resto del grupo de investigación.

## **II.1 Datos personales de los autores:**

JUAN JOSE CEREZO-MANCHADO, Investigador pre-doctoral y especialista en hematología y hemoterapia, Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: juanjose.cerezo@um.es, Tlf: 968360009.

ANA ISABEL ANTON, Investigadora post-doctoral, Centro Regional de Hemodonación. Hospital Reina Sofía. Laboratorio de Genómica. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: anai.anton@carm.es, Tlf: 968341990.

JOSE PADILLA, Técnico de laboratorio, Centro Regional de Hemodonación. Hospital Reina Sofía. Laboratorio de Genómica. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: josepadilla@um.es, Tlf: 968341990.

VIRGINIA PEREZ-ANDREU, Investigadora post-doctoral. Department of Pharmaceutical Sciences, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA E-mail: virpean@yahoo.es.

JAVIER CORRAL, Profesor Titular. Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: javier.corral@carm.es Tlf: 968341990.

VICENTE VICENTE, Catedrático. Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: vicente.vicente@carm.es, Tlf: 968341990.

MARIO ROSAFALCO, Software Project Manager, Instrumentation Laboratory S.p.A, E-mail: Rosafalco@mail.ilww.it, Mobile Phone: +39 335 5996516, Italia.

NURIA GARCIA-BARBERA, Técnico de laboratorio. Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: nurgarbar@gmail.com, Tlf: 968341990.

ANA BELÉN MARTÍNEZ, especialista en hematología y hemoterapia, Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: anab.mart13@gmail.com, Tlf: 968360900.

ANA BELÉN ARROYO, investigadora pre-doctoral. Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: anabelen.arroyo@um.es. Tlf: 968341990.

ROCIO GONZALEZ-CONEJERO, Profesora Titular, Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: rocio.gonzalez@carm.es, Tlf: 968341990.

VANESSA ROLDAN, Profesora Titular. Centro Regional de Hemodonación. Hospital Morales Meseguer. UMU-IMIB, Murcia. E-mail: vroidans@um.es, Tlf: 968360969.

## **II.2 Datos de las revistas:**

**PLOS ONE** (eISSN-1.932-6203) es una revista revisada por expertos, de libre acceso, para la publicación internacional. JCI=3.730. (Primer decil, 7/56 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES). U.S. Headquarters 1160 Battery Street Koshland Building East, Ste. 100 San Francisco, USA.

**Pharmacogenomics** (ISSN 1462-2416) es una revista revisada por investigadores estrechamente involucrados en esta área de rápido desarrollo. (Primer cuartil, 47/261 PHARMACOLOGY & PHARMACY). JCI=3.857. Future Medicine Ltd, Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK. England & Wales.

**Thrombosis and Haemostasis** (ISSN 0340-6245) publica artículos sobre investigación básica y clínica en cualquier área de la trombosis y hemostasia. JCI=6.094. (Primer decil, 6/67, HEMATOLOGY). Schattauer Publishers, Stuttgart.

### III. PRINCIPALES RESULTADOS

Durante los últimos años numerosas investigaciones han tratado de esclarecer cuáles eran los motivos de la gran variabilidad de dosis inter-paciente en el tratamiento con Acenocumarol. Como consecuencia de estos estudios se ha comprobado el papel relevante de varios polimorfismos en el metabolismo del Acenocumarol (tales como rs9923231 en VKORC1, rs1799853 y rs1057910 en CYP2C9, ó rs2108622 en CYP4F2) y de varios factores clínicos como la edad, el género o la SC. A pesar de ello aproximadamente un 50% de la variabilidad de dosis sigue sin ser explicada, lo que justifica la búsqueda de nuevos factores relevantes. Además, el impacto de estos factores en el inicio de la terapia y, por lo tanto, en la posible aplicación clínica que pudiera derivarse de estos hallazgos para el cálculo de una dosis individualizada para cada paciente, tampoco ha sido bien estudiado hasta la fecha para el tratamiento con Acenocumarol.

Por ello, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido la ponderación de factores actualmente conocidos y la búsqueda de otros nuevos, que tengan influencia en la dosis estable de la terapia con Acenocumarol. Este conocimiento ha dado lugar a diferentes aplicaciones clínicas, sobre todo al inicio del tratamiento, ya que permite el cálculo de una dosis personalizada para cada paciente, lo que podría disminuir el riesgo de hemorragia o trombosis inherente a la variabilidad inter-individual conocida del propio fármaco y propiciada por el método tradicional de dosificación del mismo, basado en ensayo/error. Por este motivo se plantearon cuatro objetivos y se obtuvieron los siguientes resultados principales que muestro globalmente a continuación:

**En primer lugar** tratamos de caracterizar nuevas variantes génicas en VKORC1, el principal determinante de la dosis de Acenocumarol, que estuvieran relacionadas con requerimientos extremos y que pudieran en un futuro ser incluidas en un algoritmo de predicción de dosis. Para ello estudiamos una población de 3949 pacientes donde los tres principales determinantes genéticos de la dosis de Acenocumarol, rs9923231 en VKORC1 y los dos SNPs de CYP2C9, se combinaron para definir 18 perfiles genéticos.

Para cada perfil, se identificaron las dosis medias. Los pacientes con requerimientos de dosis fuera de la media  $\pm 2$  desviaciones estándar, de acuerdo a su perfil genético, fueron identificados como valores atípicos o extremos. Se excluyeron pacientes con factores clínicos que explicaran los requerimientos de dosis extremas, así como los pacientes con datos clínicos no disponibles. En el resto de pacientes (todos con dosis más altas de lo esperado) se secuenciaron el promotor y las regiones codificantes de VKORC1. Identificamos cambios genéticos de VKORC1 en 14/57 pacientes. Cuatro pacientes fueron portadores de variantes de VKORC1 ya conocidas por su relación con dosis altas de dicumarinas (L128R, n=1 y D36Y, n=3). También se identificaron tres polimorfismos: rs17878544 (n=5), rs55894764 (n=4) y rs7200749 que estaba en desequilibrio de ligamiento con rs17878544 (n=2). Por último, dos pacientes habían perdido el ligamiento entre rs9923231/rs9934438. Posteriormente realizamos un análisis de regresión lineal multivariado para clarificar cuáles de estas variantes tenían influencia en la predicción de dosis. Como resultado, sólo los polimorfismos D36Y y rs55894764 afectaban significativamente a la dosis aunque la mejora en el modelo de predicción fue pequeña (de 39% al 40% incluyendo estas variantes).

**En segundo lugar** procedimos a estudiar la influencia de los polimorfismos más relevantes, rs9923231 (VKORC1), rs1799853 y rs1057910 (CYP2C9) y rs2108622 (CYP4F2) en el riesgo de sobredosificación y en el tiempo hasta alcanzar una dosis estable. Estudiamos a 941 pacientes de forma retrospectiva que habían iniciado la anticoagulación en nuestra unidad y se siguieron durante 3 meses. El tiempo medio para alcanzar INR terapéutico en nuestro estudio fue de 70 días. Se realizó un modelo de regresión de Cox incluyendo tanto factores clínicos como genéticos. En el análisis multivariado sólo el genotipo de VKORC1 fue estadísticamente significativo: los sujetos rs9923231 AA necesitaron menos días (mediana 41 días) para alcanzar un INR estable que los pacientes GG (HR 113; IC 95%: 1,063-1,202; p <0,001). En cuanto a la sobredosificación, 275 pacientes (29%) alcanzaron un INR > 4 dentro de los 3 primeros meses de terapia. Posteriormente comprobamos mediante el uso de una prueba de Long-Rank, que los pacientes que sufrían un mayor exceso de anticoagulación por unidad de tiempo fueron aquellos que portaban cualquiera de los 3 genotipos siguientes: VKORC1 rs9923231 AA, CYP2C9\*3 y CYP4F2 CC. Además realizamos

también un análisis multivariado donde estos resultados se mantenían independientemente de las variables clínicas incluidas en el modelo, y del INR de los pacientes a las 72 horas. Ello demuestra la influencia de dichos genotipos en el control del INR al inicio de la anticoagulación y por primera vez, describimos la influencia del polimorfismo CYP4F2 en el riesgo de sobredosificación al inicio de la terapia con Acenocumarol.

**En tercer lugar**, con toda esta información procedimos a la creación de un algoritmo de predicción de dosis que combinara variables clínicas y genéticas con el fin de que los paciente alcancen en menor tiempo la dosis estable y así reducir el riesgo de sangrado y trombosis, más frecuente al inicio de la terapia. Para ello realizamos un estudio retrospectivo con 973 pacientes, que habían iniciado la anticoagulación en nuestra Unidad. Incluimos como variables clínicas la edad, la SC, el género, y como variables genéticas los principales polimorfismos de VKORC1, CYP2C9 y de CYP4F2 alcanzando un potencial de predicción del 50%. Posteriormente este resultado fue validado en una cohorte de 2683 pacientes adicionales, alcanzando una predicción del 51%. Nuestro algoritmo proporciona la mejor predicción si se considera la estimación de dosis con un margen del 20% de la dosis real. Respecto a los modelos clínicos o genéticos por separado, el algoritmo clínico/genético sitúa más pacientes dentro del margen de dosis real ( $\pm 20\%$ ). Se encontró que los mejores resultados de las estimaciones para el algoritmo global en comparación con el resto tuvieron lugar en los pacientes que tomaban dosis bajas o altas de Acenocumarol, es decir  $\leq 7\text{mg/semana}$  y  $\geq 25\text{ mg/semana}$ .

**Finalmente**, y aunque fuera del cuerpo principal de la presente Tesis Doctoral, realizamos un estudio prospectivo con 180 pacientes que se aleatorizaron para ser controlados de forma clínica, es decir de manera habitual, o mediante un programa informático diseñado para poner en práctica nuestro algoritmo. Se siguió a los pacientes hasta que alcanzaron el objetivo del estudio (dosis estable), con un tiempo máximo (6 meses) ó hasta la pérdida de información. El objetivo principal fue comprobar en qué rama mayor número de pacientes alcanzaban el objetivo, globalmente y por unidad de tiempo. Sesenta y seis de los 92 pacientes que se

incluyeron finalmente en la rama clínica (73%) alcanzaron el objetivo a los 6 meses. En caso de la rama guiada por el algoritmo, setenta y dos pacientes (81%) alcanzaron el objetivo en ese tiempo. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado los pacientes controlados de forma habitual necesitaron 123 días para alcanzar el objetivo y los de la rama genética sólo 95, pero una vez más las diferencias no fueron significativas. En el análisis de Kaplan-Meier, los pacientes controlados por el algoritmo necesitaron estadísticamente menor tiempo para alcanzar el objetivo. Al analizar los 3 primeros meses de seguimiento observamos una diferencia significativa en el porcentaje de pacientes que alcanzaron el objetivo por rama. Así, 23 pacientes (25%) alcanzaban el objetivo en la rama clínica, un porcentaje estadísticamente menor que en la rama del algoritmo, donde 34 pacientes (38%) consiguieron el objetivo ( $p=0,049$ ). En materia de seguridad no hubo diferencias entre las dos ramas. Los detalles del estudio se han expuesto en el Anexo 1.

#### IV. CONCLUSIONES FINALES

A lo largo de esta Tesis Doctoral hemos comprobado la influencia que tienen los polimorfismos rs9923231 de VKORC1, rs1799853 y rs1057910 de CYP2C9 y rs2108622 de CYP4F2 en el control del tratamiento con Acenocumarol al inicio de la terapia. De los resultados del primer objetivo (búsqueda de nuevas variantes génicas que influyeran en la dosis estable de la terapia oral anticoagulante, de cara a incluirlas en un futuro algoritmo), concluimos que dada la baja frecuencia de las nuevas variantes encontradas y de la pequeña mejora que supone su incorporación al algoritmo de predicción de dosis (~1%), no encontramos argumentos que justifiquen su inclusión en dichos métodos predictivos.

Al abordar el segundo objetivo valoramos cuáles eran los principales factores clínicos y genéticos que tenían mayor relevancia para un control óptimo de la terapia oral al inicio del tratamiento. Los resultados de este trabajo muestran que el INR a las 72 horas del inicio de la terapia es un potente predictor de los principales objetivos de la misma, sobre-anticoagulación y dosis estable a los tres meses del inicio. Adicionalmente, además del efecto bien conocido de los polimorfismos de VKORC1 y CYP2C9, el polimorfismo rs2108622 de CYP4F2 tiene un efecto significativo en la sobre-dosificación de Acenocumaro durante los primeros tres meses de tratamiento.

Con estos datos posteriormente elaboramos un algoritmo de predicción de dosis estable. Con nuestros datos, el mejor modelo de predicción de dosis incluye factores clínicos (edad y superficie corporal) y genéticos (polimorfismos de VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2) y explica hasta el 50% de la variación de la dosis. Este algoritmo resulta especialmente útil para pacientes que necesitan dosis extremas de Acenocumarol ( $\leq 7$ mg/semana y  $\geq 25$ mg/semana), ya que proporciona una estimación en un rango de  $\pm 20\%$  de la dosis real. Dado que estos pacientes son los que normalmente necesitan más tiempo para su estabilización y son los que con más frecuencia sufren efectos adversos derivados del tratamiento, puede ser relevante emplear este algoritmo en la práctica clínica en nuestra población.

Y finalmente, aunque fuera del cuerpo principal de esta Tesis, realizamos un estudio aleatorizado donde comprobamos la eficacia y seguridad de nuestro algoritmo de predicción de dosis comparado con el sistema habitual de dosificación en dos grupos de pacientes. De los resultados de este trabajo se concluye que la inclusión del valor del INR a las 72 horas en el sistema de dosificación que tiene en cuenta la información genética es crucial para que este esquema sea superior al método clásico en los objetivos analizados (porcentaje de pacientes con dosis estable, porcentaje de INRs en rango y tiempos para alcanzar ambos objetivos). Sin embargo, a los 6 meses de inicio del tratamiento, la valoración de estos objetivos se iguala en ambas ramas, de donde podemos concluir que la información genética es especialmente relevante al inicio de la terapia (3 primeros meses). Tras este periodo, otros factores inherentes a los pacientes van modulando la dosis necesaria para estar en INR terapéutico.

## D. BIBLIOGRAFIA

Al Hajje A.H., C. N., Bosson J.L., Calop J., Allenet B., (2010). "Which factors are associated to hemorrhagic adverse drug events related to antivitamin K?" Ann Pharm Fr **68**(1): 36-43.

Alonso-Coello P. (2012). "Antithrombotic therapy in peripheral artery disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines." Chest. **141**((2 Suppl)).

Anderson J.L., H. B., Stevens SM, Woller SC, Samuelson KM, et al. and (2012). "A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II)." Circulation **125**(16): 1997-2005.

Ansell J., H. J., Hylek E., Jacobson A., Crowther M., Palareti, G.P. (2008). "Pharmacologic and management of the Vitamin K Antagonist; American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines." Chest **6**(13): 160S-198S.

Beinema M., B. J. R., Schalekamp T., Wilffert B., (2008). "Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon." Thromb. Haemost. **100**(6): 1052-1057.

Bodin L., V. C., Tregouet D.A., Robert A., Dubert L., et al. (2005). "Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity." Blood. **106**(1): 135-140.

Borobia A.M., L. R., Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, et al. (2012). "An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease." PLoS One **7**(7).

Breckenridge A.M. (1978). "Oral anticoagulant drugs: pharmacokinetic aspects." Semin. Hematol. **15**(1): 19-26.

Buitenhuis H.C., S. B. A., Vermeer C. (1990). "Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase." Biochim. Biophys Acta **1034**(2): 170-175.

Cadamuro J., D. B., Felder T., Kedenko I., Mueller T., et al. (2010). "Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements." Eur J Clin Pharmacol **66**: 253-260.

Caldwell M.D., A. T., Johnson JA. (2008). "CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose." Blood **111**: 4106-4112.

Caraco Y., B. S., Muszkat M, (2008). "CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study." Clin Pharmacol Ther **83**((3)): 460-470.

Cerezo-Manchado J.J., R. M., Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, et al. (2013). "Creating a genotype based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose." ThrombHaemost **109**(1): 146-153.

Cerezo-Manchado J.J., R. V., Rosafalco M., Antón A.I., Arroyo A.B., Garcia-Barberá N., Martínez A.B., Padilla J., Corral J., Vicente V. & González-Conejero R.; (2014). "Effect of VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic variants in early outcomes during acenocoumarol treatment." Pharmacogenomics (in press).

Cesar J.M., G.-A. A., Navarro J.L., Herraes M.V. (2004). "Aging and oral anticoagulant therapy using acenocoumarol." Blood Coagul Fibrinolysis **15**: 673-.

Cooper G.M., J. J. A., Langaee, T.Y., Hua, Feng, Stanaway, Ian.B., et al. (2008). "A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose." Blood **112** (4): 1022-1027.

Cranenburg E.C., S. L. J., Vermeer C. (2007). "Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent;" Thromb. Haemost **98**(1): 120-125.

D'Ambrosio R.L., D. A. G., Cafolla A., Faillace F., Margaglione M., (2007). " A new variant vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with decreased stability of CYP2C9 enzyme." J. Thromb. Haemost. **5**(1): 191-193.

D'Ambrosio R.L., D. A. G., Capucci F., Chetta M., Di Perna P., Brancaccio V., Grandone E., Margaglione M. (2004). "Polymorphisms in factor II and factor VII genes modulate oral anticoagulation with warfarin." Haematologica **89**(12): 1510-1516.

Do E.J., L. P., Eby CS, Bass AR, McMillin GA, et al. (2011). "Genetics informatics trial (GIFT) of warfarin to prevent deep vein thrombosis (DVT): rationale and study design." Pharmacogenomics.

French B., J. J., Geller NL, Kimmel SE, Rosenberg Y, et al. (2010). "Statistical design of personalized medicine interventions: the Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics (COAG) trial." Trials **11**: 108.

Frueh F.W., A. S., Mummaneni P., Epstein R.S., Aubert R.E., DeLuca T.M., Verbrugge R.R., Burckart G.J., Lesko L.J., (2008). "Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by the United States food and drug administration: prevalence of related drug use." Pharmacotherapy **992-8(8)**: 28.

Furie B., F. B. C. (1988). "The molecular basis of blood coagulation." Cell **53(4)**: 505-518.

Gage B.F., L. L. J. (2008). "Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific and clinical issues." J. Thromb. Thrombolysis. **25(1)**: 45-51.

Garcia A.A., R. P. H. (2008). "VKORC1 and the vitamin K cycle." Vitam. Horm. **78**: 23-33.

Gong I.Y., T. R., Schwarz UI, Crown N, Dresser GK, et al. (2011). "Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy." Blood **118(11)**: 3163-3171.

Gonzalez- Conejero R., C. J., Roldan V., Ferrer F., Sánchez-Serrano I., Sánchez-Blanco J.J., Marín F, Vicente V. (2007). "The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol." Thromb. Haemost. **5(8)**: 1701-1706.

Gonzalez-Conejero R., C. J., Roldan V, Vicente V. (2008). "Gamma-glutamyl carboxylase R325Q polymorphism on the response of acenocoumarol." Thromb. Res. **122(3)**: 429-431.

Haining R.L., H. A. P., Veronese M.E., Trager W.F., Rettie A.E., (1996). "Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and 135L mutant forms." Arch. Biochem. Biophys **333(2)**: 447-458.

Harrington D.J., G. R., Wheeler R., Davidson S., Murden S., Morse C., Shearer M.J., Mumford A.D., (2008). "Pharmacodynamic Resistance to Warfarin is associated with Nucleotide Substitutions in VKORC1." J. Thromb. Haemost **6(10)**: 1663-1670.

Herman D., P. P., Stegnar M., Breskvar K., Dolzan V. (2006). "The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement." Thromb. Haemost. **95(5)**: 782-787.

Hirsch J., D. J., Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J (1998). "Oral anticoagulants: mechanisms of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range." Chest **114**: 445-469.

Jacobson A. (2012). "Is there a role for warfarin anymore?" Hematology Am Soc Hematol Educ Program(541-6).

James A.H., B. R. P., Raskino C.L., Thompson S.G. (1992). "Factors affecting the maintenance dose of warfarin." J. Clin. Pathol. **45**(8): 704-706.

Jose L., B. C., Chandy S.J., Mathews J.E., Mathews K.P., (2008). "Acenocoumarol and phenytoin toxicity in the presence of CYP2C9 mutation." J. Assoc. Physicians India **56**: 250-252.

Khon M.H., P. H. J. (2000). "A gene-anchored map position of the rat warfarin resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans." Blood. **96**(5): 1996-1998.

Kim M.J., H. S., Meyer UA, Rahman A, Lesko LJ. (2009). "A regulatory science perspective on warfarin therapy: a pharmacogenetic opportunity." J Clin Pharmacol. **49**: 138-146.

Kinoshita H., N. K., Narusawa K., Goseki-Sone M., Fukushi-Irie M, et al. (2007). "A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women." Bone **40**(2): 451-456.

Klein T.E., A. R., Eriksson N, et al. (2009). "Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data." N Engl J Med **360**: 753-764.

Laurance S., L. C., Blostein MD, (2012). "Growth arrest-specific gene 6 (*gas6*) and vascular hemostasis." Adv Nutr. **3**(2): 196-203.

Lee S.C., N. S. S., Oldenburg J., Chong P.Y., Rost S., Guo J.Y., Yap H.L., Rankin S.C., Khor H.B., Yeo T.C., Ng K.S., Soong R., Goh B.C. (2006). "Interethnic variability of warfarin maintenance requirement in explained by VKORC genotype in an Asian population." Clin. Pharmacol. Ther. **79**(3): 197-205.

Li T., C. C. Y., Jin D.Y., Lin P.J., Khvorova A., Stafford D.W., (2004). "Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase." Nature **427**(6974): 541-544.

Llibre J.M., R. J., Lopez E., Sirera J. (2002). "Severe interaction between ritonavir and acenocoumarol." Ann.Pharmacother **36**(4): 621-623.

McDonald M.G., R. M. J., Nakano M., Hsia C.K., Rettie A.E. (2009). "CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant." Mol. Pharmacol. **75**(6): 1337-1346.

Meckley L.M., W. A., Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. (2008). "An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients." Thromb. Haemost. **100**(2): 229-239.

Mondillo S., B. P., Galderisi M., (2005). "Rosuvastatin-acenocoumarol interaction." Clin. Ther. **27**(6): 782-784.

Oldenburg J., M. M., Müller-Reible C., Watzka M., (2008). "The vitamin K cycle." Vitam Horm **78**: 35-62.

Palareti G., L. C. (1996). "Warfarin withdrawal; Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations." Pharmacokinet. **30**(4): 300-313.

Pengo V. (2006). "Management of oral anticoagulant treatment in patients with venous thromboembolism." Semin Thromb Hemost **32**(8): 781-786.

Perez-Andreu V., R. V., Lopez-Fernandez MF, Anton AI, Alberca I, Corral J., et al. (2010). "Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose requirements." J Thromb Haemost **8**: 1012-1017.

Pirmohamed M., e. a. (2013). "A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin." N Engl J Med. **369**(24): 2294-2303.

Rettie A.E., W., L.C., Gonzales F.J., Trager W.F., Korzekwa K.R., (1994). "Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9." Pharmacogenetics **4**(1): 39-42.

Rieder M.J., R. A. P., Gage, B.F., Nickerson D.A., et al. (2005). "Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose." N. Engl. J. Med **52**(22): 2285-2293.

Rost S., F. A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Pelz H.J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E.G., Müller C.R., Strom T.M., Oldenburg, J. (2004). "Mutations in VKORC cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2." Nature **427**: 537-541.

Schalekamp T., B. B., Roijers JFM, van Meegen E, et al. (2007). "VKORC1 and CYP2C9 genotypes and phenprocoumon anticoagulation status: interaction between both genotypes affects dose requirement." Clin Pharmacol Ther **81**: 185-193.

Schalekamp T., v. G.-D. J. H., Kramer M.H. , et al. (2007). "Coumarin anticoagulants and cotrimoxazole: avoid the combination rather than manage the interaction." Eur. J.Clin. Pharmacol **63**(4): 335-343.

Shearer M.J., N. P. (2008). "Metabolism and cell biology of vitamin K." Thromb Haemost **100**: 530-547.

Spreafico M., L. C., van LY, et al. (2008). "Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy." Pharmacogenomics **9**(9): 1237-1250.

Stafford D.W. (2005). "The vitamin K cycle." J Thromb Haemost **3**(8): 1873-1878.

Sullivan-Klose T.H., G. B. L., Bell D.A., Zhang Z.Y., Kaminsky L.S., Shenfield G.M., Miners J.O., Birkett D.J., Goldstein J.A., (1996). "The role of the CYP2C9 Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism." Pharmacogenetics **6**(4): 341-349.

Takanashi K., T. H., Kobayashi K., Yasumori T., Hosakawa M., Chiba K. (2000). "CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates." Pharmacogenetics **10**(2): 95-104.

Takeuchi F., M. R., Bourgeois S., Barnes C., Eriksson N., Soranzo N., Whittaker P., Ranganath V., Kumanduri V., McLaren W., Holm L., Lindh J., Rane A., Wadelius M., Deloukas P. (2009). "A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose." PLoS Genet **5**(3).

Teichert M., E. M., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., van Schaik R.H., Hofman A., De Smet P.A., van Gelder T., Visser L.E., Stricker B.H. (2009). "A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage." Hum Mol Genet. **18**(19): 3758-3768.

Teichert M., v. S. R., Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PA, Stricker BH, Visser LE. (2009). "Genotypes Associated With Reduced Activity of VKORC1 and CYP2C9 and Their Modification of Acenocoumarol Anticoagulation During the Initial Treatment Period." Clinical pharmacology & Therapeutics **85**.

Thijssen H. H., F. J. P., Beaune P. H., (2000). "Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes." Drug Metabol Dispos **28**: 1284-1290.

Thijssen H. H., W. J. G. M., J. Baars L., G. M., (1985). "Lack of effect of cimetidine on pharmacodynamics and kinetics of single oral doses of R- and S-acenocoumarol." Eur J Clin Pharmacol **30**: 619-623.

Ufer M. (2005). "Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol." Clin Pharmacokinet **44**: 1227-1246.

van Schie R.M., W. J., le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, et al., EU-PACT Study Group. (2011). "Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data." Eur Heart J. **32**(15): 1909-1917.

van Schie R.M., W. M., Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, et al. (2009). "Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design." Pharmacogenomics **10**(10): 1687-1695.

Vecsler M., L. R., Almog S., Kurnik D., Goldman B., Halkin H., Gak E. (2006). "Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin." Thromb. Haemost. **95**(2): 205-211.

Verde Z., R. J., Santiago C, Valle B, Bandre's F, et al. (2010). "A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants." PLoS One **5**(6).

Verhoef T.I., R. G., de Boer A., Barallon R., Kolovou G., Kolovou V., Konstantinides S., Le Cessie S., Maltezos E., van der Meer F.J., Redekop W.K., Remkes M., Rosendaal F.R., van Schie R.M., Tavridou A., Tziakas D., Wadelius M., Manolopoulos V.G., Maitland-van der Zee A.H.; EU-PACT Group (2013). "A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon." N Engl J Med **12**(369).

Verhoef T.I., R. W., Hegazy H, de Boer A, Maitland-van der Zee AH; EU-PACT group. (2012). "Long-term anticoagulant effects of CYP2C9 and VKORC1 genotypes in phenprocoumon users." J Thromb Haemost.

Visser L.E., T. P., De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, (2005). "Patients with an APOE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants." Pharmacogenet Genomics **15**(2): 69-74.

Wajh N., S. D. C., Hutson S.M., Wallin R. (2004). "The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gammacarboxylation system; Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats." J. Biol. Chem. **279**(24): 25276-25283.

Wang D., C. H., Momary K.M., Cavallari L.H., Johnson J.A., Sadée W., (2009). "Regulatory polymorphism in Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement." Blood **113**(6): 1393-1394.

Watt B.E., P. A. T., Bradberry S.M., Vale J.A. (2005). "Anticoagulant rodenticides." Toxicol Rev **24**(4): 259-269.



## **E. ANEXOS**

### **ANEXO 1: ESTUDIO PILOTO**

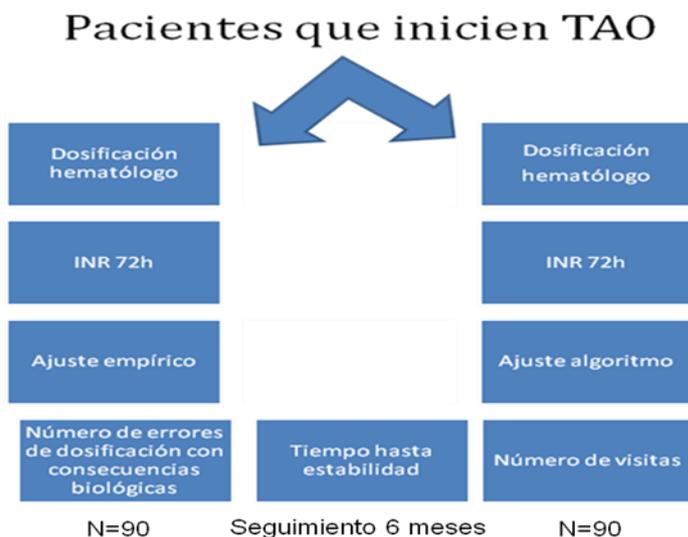
EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE UN SISTEMA DE GESTIÓN TERAPÉUTICA BASADO EN FACTORES CLÍNICOS Y FARMACOGENÉTICOS PARA PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTICOAGULANTE ORAL FRENTE A LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL.

Como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, encontrar la dosis de Acenocumarol estable y en rango terapéutico lo antes posible es importante para evitar periodos donde existe mayor riesgo hemorrágico o tromboembólico debido a la administración de dosis deletéreas (por exceso o defecto de las verdaderas necesidades de cada paciente). Basado en el análisis retrospectivo de una población de 973 pacientes hemos determinado la relevancia tanto de factores clínicos (sexo, edad, superficie corporal y medicación concomitante) como de factores genéticos para diseñar un algoritmo terapéutico que es capaz de predecir la dosis anticoagulante con un margen de error del 20%. Con este algoritmo hemos pretendido calcular la dosis necesaria de Acenocumarol al inicio de la terapia, para así acortar el tiempo en alcanzar el rango terapéutico evitando las complicaciones que ocurren durante el periodo inicial (Cerezo-Manchado J.J. 2013).

#### **I. Diseño del ensayo:**

Diseñamos un ensayo de dos grupos paralelos aleatorizados en abierto que compara la seguridad y eficacia de la dosificación del tratamiento anticoagulante oral con Acenocumarol basándose en parámetros genéticos frente a la práctica clínica habitual.

El inicio del tratamiento será igual para ambos grupos, pero a las 72 horas y con el primer INR de control, un grupo seguirá tratado con la práctica clínica habitual y en el otro grupo se calculará la dosis siguiente después de aplicar el algoritmo diseñado, el cual utiliza los genotipos de los pacientes (Cerezo-Manchado J.J. 2013). La inclusión de pacientes se hará mediante aleatorización simple (Figura 3).



**Figura 3.** Diseño del estudio

## II. Objetivo principal:

Acortar el tiempo a la estabilización de la dosis necesaria para mantener un INR terapéutico. De esta forma aumentaremos la eficacia y seguridad del Acenocumarol y evitaremos las complicaciones que pueden ocurrir cuando el paciente está fuera de rango terapéutico.

### Objetivos secundarios:

- Reducción del número de complicaciones hemorrágicas al inicio de la anticoagulación.
- Reducción del número de complicaciones tromboembólicas al inicio de anticoagulación.

## III. Control de dosis en los grupos experimentales

El **grupo del algoritmo** recibió la dosis de Acenocumarol estándar en función de su edad, superficie corporal y medicación concomitante tal y como se hace en la práctica clínica diaria. A las 72 horas, con el dato del primer INR, se calculó la dosis que precisaba el paciente para llegar al rango terapéutico en función de su genotipo. El cálculo de dosis se realizó tantas veces como fue necesario hasta que se alcanzó la

variable principal de estudio, esto es, la dosis necesaria para mantener un INR en rango terapéutico durante tres veces seguidas sin modificación de la misma.

El **grupo control** fue tratado según la práctica clínica diaria.

A todos los pacientes se les realizó una analítica completa (hemograma, bioquímica y pruebas de coagulación) según es habitual. De esa analítica se obtuvo la muestra necesaria para el estudio farmacogenético en todos los pacientes. El genotipo se determinó entre el día de inclusión del paciente y la aleatorización del mismo (72 horas). El genotipo de los pacientes del grupo control fue desconocido para los investigadores hasta el final del estudio, pero una vez que se analizaron los datos nos permitió estimar cuánto tiempo se habría ahorrado para alcanzar el rango terapéutico en dichos pacientes.

Los pacientes de ambos grupos fueron atendidos de forma similar. En ambos casos se realizaron todos los controles de INR de la práctica diaria, salvo que en el grupo de dosis guiada por algoritmo, la dosis fue calculada mediante un procedimiento matemático y en el grupo control, tal y como se viene haciendo actualmente en la práctica clínica diaria. Los pacientes no fueron sometidos a ninguna prueba especial de más, ya que la muestra para el estudio farmacogenético se obtuvo de la analítica inicial que se hace a todos los pacientes que inician tratamiento anticoagulante. En cualquier caso, la dosis calculada por parámetros genéticos fue siempre supervisada por el hematólogo y quedó a criterio de éste aplicarla o no.

#### **IV. Variable principal de valoración.**

Tiempo a la estabilidad terapéutica, es decir el tiempo que tarda el paciente en alcanzar el rango terapéutico con aquella dosis que dé lugar a tres determinaciones de INR dentro de rango terapéutico sin precisar modificarla.

## **V. Criterios de inclusión, exclusión y retirada**

### Criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 18 años con indicación de anticoagulación oral con Acenocumarol que precise un INR terapéutico entre 2-3 durante al menos 6 meses.
  - a. Pacientes con fibrilación auricular crónica, valvular o no valvular.
  - b. Pacientes con trombosis venosa profunda.
  - c. Pacientes con tromboembolismo de pulmón.
  - d. Pacientes con isquemia arterial periférica.
2. Pacientes que hayan otorgado su consentimiento informado para participar en el estudio.

### Criterios de exclusión:

1. Pacientes menores de 18 años.
2. Pacientes que precisen un rango terapéutico entre 2.5-3.5.
3. Pacientes que hayan iniciado ya el tratamiento antitrombótico antes de la primera consulta.
4. Pacientes con alteración de la función hepática (cifras de transaminasas 2 veces su valor normal).
5. Pacientes con alteración previa de la hemostasia.
6. Pacientes que hayan presentado un evento hemorrágico los 15 días previos al estudio o presenten riesgo del mismo.
7. Mujeres embarazadas o durante el periodo de lactancia.
8. Desaprobación del consentimiento informado.

### Criterios de retirada:

1. Pacientes en los que algoritmo calcule una dosis desproporcionadamente elevada.
2. Retirada del consentimiento informado.
3. Evento hemorrágico.
4. Evento tromboembólico.
5. Cualquier otro acontecimiento adverso.

6. Por criterio médico.
7. Pérdida de seguimiento.

## **VI. Desarrollo del estudio.**

**Visita basal:** la inclusión de los pacientes se hizo desde la Consulta Externa de anticoagulación del Hospital Universitario Morales Meseguer donde son referidos los pacientes para iniciar tratamiento anticoagulante oral. Cuando el paciente cumplía los criterios de inclusión se procedió a iniciar tratamiento con Acenocumarol según la práctica clínica diaria y fue aleatorizado para que las posteriores dosificaciones de Acenocumarol se hicieran basándose bien en parámetros genéticos bien según la práctica clínica diaria. Se recogieron los siguientes datos: sexo, edad, peso y talla, motivo de anticoagulación, medicación concomitante, otras comorbilidades.

**Día +4:** el paciente acudió a control y se procedió a realizar un control de INR mediante punción capilar según la práctica clínica diaria de la Consulta de anticoagulación. Con el valor del INR:

Si el paciente pertenecía al grupo de estudio: se calculó la siguiente dosis según el algoritmo diseñado.

Si el paciente pertenecía al grupo control: se administró la siguiente dosis según práctica clínica diaria.

Durante las sucesivas visitas en cada grupo el tratamiento fue prescrito en función de la rama, en el grupo de estudio se siguió aplicando el algoritmo diseñado hasta alcanzar el rango terapéutico, momento en el cual se mantuvo la dosis. El grupo control se dosificó como habitualmente.

En cualquier caso tanto la dosificación del grupo de estudio como la del grupo control estuvo siempre supervisada por el hematólogo pudiendo en todo momento retirar al paciente del grupo de estudio si la dosis no era adecuada.

Los INR supratrapéuticos superiores a 4.0 se manejan según los protocolos clínicos de la unidad.

**Variables recogidas:**

Dosis inicial.

Dosis final.

Tiempo a primer INR terapéutico.

Tiempo a estabilidad final.

Nº de INR supratrapéuticos.

Nº de INR infratrapéuticos.

**VII. Análisis estadístico.**

Las variables cualitativas se expresaron mediante porcentajes. Se estudió si las variables cuantitativas seguían una distribución normal. Estas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o mediana (si no se ajustaban a la normalidad como rango intercuartílico). Para analizar la relación entre dos variables cualitativas, se utilizó el test de la Chi-cuadrado. El análisis de asociación entre variables cualitativas y cuantitativas se realizó mediante el test t de Student (o U de Mann Whitney en caso necesario). Para el estudio de correlación entre dos variables cuantitativas se realizó el test de Pearson (o Spearman). Para el estudio de asociación del algoritmo diseñado con el tiempo al rango terapéutico (variable principal) se realizó un análisis multivariado mediante regresión lineal (ajustando por otras variables de confusión, fundamentalmente edad, sexo, índice de masa corporal y fármacos asociados) así como la asociación con la aparición de complicaciones embólicas/hemorrágicas mediante regresión de Cox.

**VIII. Consideraciones éticas.**

Este protocolo se llevó a cabo según la legislación vigente (Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero de 2004), con respeto a las normas de Buena Práctica Clínica

CPMP/ICH/135/95 y a los principios enunciados en la Declaración de Helsinki (actualizada en la 59ª Asamblea de Seul, Corea 2008). El Comité de Ética del Hospital Morales Meseguer (Murcia) dio su aprobación para la realización del ensayo. Todos los pacientes participantes dieron consentimiento informado a su inclusión en el ensayo. Los investigadores implicados se comprometieron a tratar con confidencialidad los resultados del mismo.

### **IX. Seguimiento.**

El periodo de seguimiento fue hasta alcanzar el objetivo principal de valoración con un máximo de 6 meses.

### **X. Resultados.**

#### **X.1. Características de los pacientes**

Un total de 180 pacientes fueron seleccionados como calculamos al principio del ensayo. Finalmente 92 pacientes fueron incluidos en el grupo estándar, 88 en el brazo algoritmo. Las características demográficas basales, así como las frecuencias de los polimorfismos genéticos seleccionados fueron muy similares en los dos grupos, como se muestra en la Tabla 2.

#### **X.2. Porcentaje de pacientes con dosis estable**

Al final de los tres meses en los que se hizo la monitorización de la dosis en ambas ramas de forma separada, 23 pacientes de la rama con dosificación habitual (25%) alcanzaron una dosis estable frente a los 34 pacientes (38%) de la rama guiada por datos genéticos ( $p=0,049$ ). A los 6 meses de seguimiento, estas diferencias disminuyeron, ya que 66 pacientes (73%) de la rama habitual alcanzaron el objetivo en comparación con 72 pacientes (81%) pertenecientes a la rama guiada por genotipos ( $p=0,07$ ) (Figura 4).

### **X.3. Tiempo hasta dosis estable**

La mediana de tiempo necesaria para alcanzar la dosis estable terapéutica en la rama de dosificación clínica fue de 123 días. Los pacientes que siguieron la dosificación por genotipos registraron la primera dosis estable en una media de 95 días, aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p=0,100$ ) (Figura 5).

Al finalizar los 6 meses de seguimiento, se realizó un análisis de Kaplan-Meier. Como se observa en la Figura 6, la cantidad de pacientes que alcanzaron la dosis estable por unidad de tiempo, fue significativamente menor en la rama con dosificación habitual que la cantidad de pacientes que lo consiguen en la rama guiada por genotipos en el mismo tiempo ( $p<0,05$ ) (Figura 6).

### **X.4. Tiempo hasta primer INR terapéutico**

La mediana de tiempo necesaria para alcanzar el primer INR terapéutico en la rama de dosificación clínica fue de 11 días. Los pacientes que siguieron la dosificación por genotipos registraron el primer INR terapéutico con una mediana de 10 días ( $p=0,7$ ) (Figura 7).

### **X.5. Porcentaje de INRs en rango terapéutico por paciente**

Durante el tiempo que los pacientes fueron seguidos en el estudio, se midió el porcentaje de INRs en rango terapéutico (2.0-3.0) para cada paciente hasta alcanzar la dosis estable. El 45% de los INRs de los pacientes que se dosificaron de forma habitual estuvieron en rango (2.0-3.0). Este porcentaje fue significativamente mayor (51%) ( $p=0,01$ ) en la rama de pacientes dosificados con datos genéticos (Figura 8).

### **X.6. Evaluación de la seguridad en ambas ramas**

Durante el seguimiento no hubo diferencias significativas ni en eventos menores entre los dos grupos de pacientes (N=10 en la habitual y N=6 en la del algoritmo;  $p= 0,24$ ) ni en los eventos mayores (N=3 y N=2, respectivamente). Tampoco encontramos

diferencias significativas en el número de ingresos hospitalarios derivados del tratamiento anticoagulante oral, ni en éxitos relacionados con la terapia. Estos datos se muestran en la Tabla 2. No hubo diferencias tampoco en el porcentaje de INR >4 por rama (30% en la clínica, 38% en la guiada por el algoritmo) ( $p=0,3$ ).

Los principales resultados de este estudio se han resumido en la Tabla 9.

## **XI. CONCLUSIONES:**

Este estudio aleatorizado compara los principales resultados de la terapia con Acenocumarol en dos ramas de dosificación, una guiada por los datos clínicos habituales a criterio del hematólogo y la otra dosificando de acuerdo con la información genética de los pacientes integrada en un algoritmo matemático diseñado previamente en nuestro grupo. En global, siempre que obtuvimos significación estadística entre ambas ramas fue a favor de la rama guiada por datos genéticos, aunque estas diferencias parecen ser más evidentes durante los tres primeros meses de tratamiento. Así, un mayor porcentaje de los pacientes incluidos en esta rama alcanzaron dosis estable y el porcentaje de INRs en rango terapéutico por paciente fue también mayor en la misma. Por contra, no hubo diferencias en cuanto a seguridad entre las dos ramas, de tal manera que los eventos menores y mayores se distribuyeron de forma similar entre los dos métodos de control. Sin embargo, este estudio carece de poder estadístico para detectar diferencias clínicamente relevantes con respecto a eventos mayores o menores, debido a la baja tasa con que normalmente ocurren en pacientes tratados con Acenocumarol (Alonso-Coello P. 2012). Pero dado que el riesgo de sangrado o de eventos tromboembólicos es más bajo cuando el paciente tiene INRs en rango terapéutico, es plausible que una intervención que incremente el tiempo en el que el paciente esté en rango se asocie también con un menor riesgo de efectos adversos.

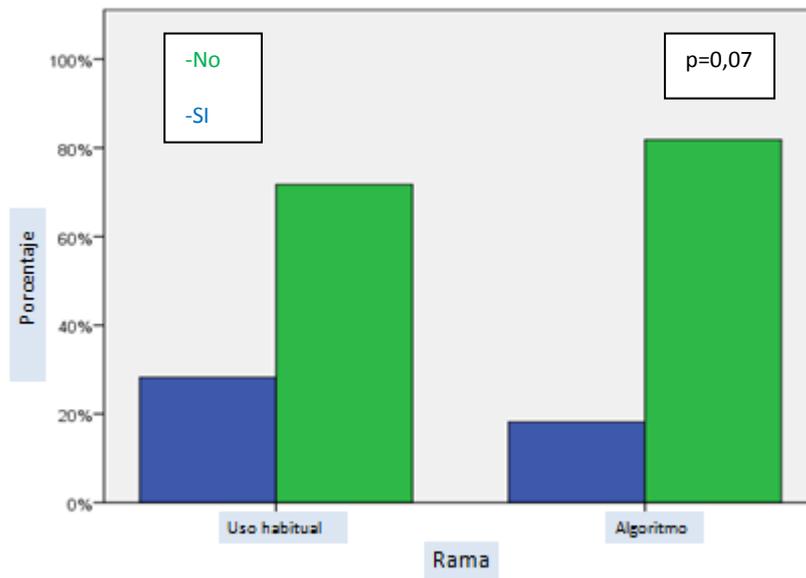
Estos resultados difieren de los descritos en la reciente publicación del consorcio EU-PACT, en la que comparan también un algoritmo genético de dosificación vs dosificación clínica habitual en pacientes que inician tratamiento con Acenocumarol (Verhoef T.I. 2013). Estos autores no encuentran diferencias relevantes entre las dos ramas de pacientes aleatorizados en ninguno de los resultados clínicos y biológicos

analizados. Las discrepancias entre estos resultados y los de nuestro trabajo podrían ser explicadas por dos factores principalmente: los pacientes reclutados y las diferencias de diseño de ambos estudios. El consorcio EU-PACT dosifica ambas ramas de acuerdo con la dosis inferida de su protocolo correspondiente desde el día 1, y en posteriores dosificaciones se aplican factores de corrección calculados previamente de acuerdo al valor del INR del día de la visita del paciente. En nuestro estudio, una vez aleatorizados los pacientes reciben la primera dosis de acuerdo con el criterio del hematólogo responsable y es a los 3 días cuando el dato del INR se combina con la información de los genotipos para obtener la estimación de la dosis sucesiva. En un trabajo previo en el que describimos el peso de los polimorfismos de VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2 en los resultados de la terapia con Acenocumarol en las fases iniciales del tratamiento (y que ha sido incluido como el segundo bloque de la presente Tesis Doctoral) el INR a las 72 horas fue un indicador muy potente del tiempo necesario hasta alcanzar la dosis estable y de la ocurrencia de INR>4 en los 3 primeros meses (Cerezo-Manchado J.J. 2014). Adicionalmente, decidimos incluir el dato del INR a las 72h en el diseño del estudio por motivos obvios de seguridad del paciente. Dadas estas diferencias entre el ensayo publicado por el consorcio y el aquí presentado, sugerimos que la consideración del dato del INR a las 72h junto con los datos genéticos podría conferir ventajas significativas a algoritmos genéticos respecto a la dosificación convencional, hipótesis que debe ser confirmada en estudios adicionales.

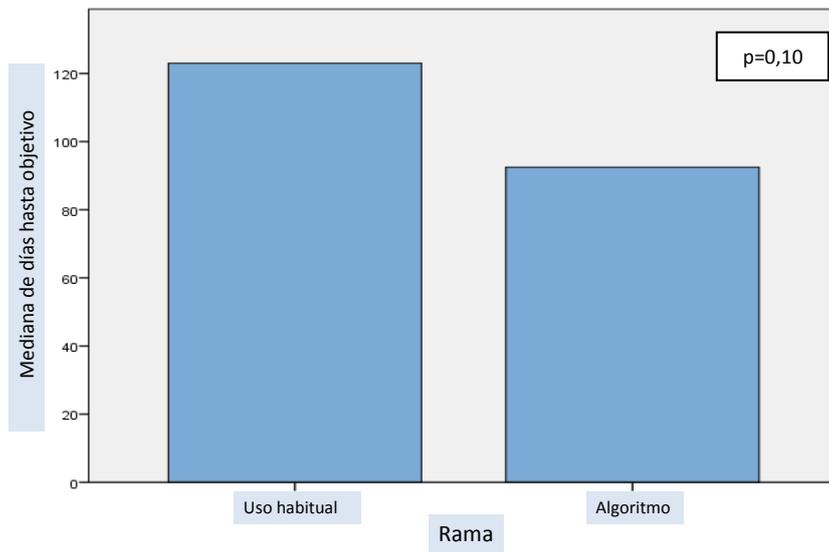
Finalmente, observamos que a los 6 meses ambos grupos de pacientes igualan objetivos. En global, de este resultado se infiere que la influencia del genotipo en el control de la dosis puede tener más peso al inicio de la terapia, de forma que con el paso de las semanas ganen relevancia el resto de factores clínicos y demográficos. Esta hipótesis ha sido avalada previamente por Verhoef *et al.* (Verhoef T.I. 2012). Estos autores describen que los pacientes portadores de polimorfismos de VKORC1 y CYP2C9 tenían más riesgo de sobredosificación en los primeros meses, aunque este efecto disminuyó después de 1-6 meses de tratamiento con Acenocumarol. Estos hallazgos se pueden justificar teniendo en cuenta que las características genéticas son invariables a lo largo de la vida del individuo, por lo que serían las interacciones gen/ambiente las que modulen las variaciones de requerimientos de dosis a lo largo de la misma.

Tabla 2. Características de los pacientes	Clínica habitual N=(92)	Algoritmo (N=88)	Valor "p"
Dosis de Acenocumarol media mg/semana (media±DE)	13.9 ±6,7	14.1 ±5.2	<b>0,41</b>
<b>Datos demográficos</b>			
Edad, A (media±DE)	69 ± 14	73±9	<b>0,46</b>
Género, hombre/mujer (N)	50/42	57/31	<b>0,15</b>
Peso, kg (media±DE)	79 ± 15	79 ± 25	<b>0,97</b>
Altura, cm (media±DE)	165 ± 9	163 ± 8	<b>0,30</b>
*BSA (media±DE)	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	<b>0,50</b>
<b>Medicación prescrita, N (%)</b>			
Amiodarona	5(5)	7 (8)	<b>0,49</b>
Fármacos antiplaquetarios	26(28)	27(30)	<b>0,72</b>
Fármacos psicotrópicos	10(11)	11 (12)	<b>0,73</b>
<b>Indicación para Acenocumarol N (%)</b>			
Fribilación auricular	76(83)	80(90)	
Trombosis venosa profunda	11(12)	4 (5)	
Embolismo pulmonar	2(2)	1 (1)	
Otros	3(3)	3(3)	
<b>Morbilidades N(%)</b>			
HTA	50(54)	60(68)	<b>0,07</b>
DM	14(15)	24(27)	<b>0,07</b>
<b>Genotipos N (%)</b>			
<b>CYP2C9*</b>			
*1/*1	57(62)	49 (55)	
*1/*2	23(25)	25 (28)	
*1/*3	9(10)	11(13)	
*2/*2	2(2)	0	
*2/*3	1(1)	2 (2)	
*3/*3	0	1(1)	
<b>VKORC1 -1639 G&gt;A</b>			
G/G	27(29)	37 (42)	
G/A	47(52)	36 (41)	
A/A	18(19)	15 (17)	
<b>CYP4F2 V433M</b>			
C/C	33(36)	31 (35)	<b>0,80</b>
C/T	45(49)	43(48)	
T/T	14(15)	14 (16)	
<b>Causa fin de seguimiento</b>			
Alcanza el objetivo	66(73)	72(81)	<b>0,08</b>
Fin de seguimiento	14(15)	6(7)	
Perdida de seguimiento	1(1)	-	
Renuncia	1(1)	1(1)	
Fin de la prescripción	6(6)	3(3)	
Efecto secundario del tratamiento	2(2)	2(2)	
Cambio a otro anticoagulante	2(2)	2(2)	
<b>Eventos menores</b>			
Eventos mayores	10(11)	6(7)	<b>0,24</b>
Ingresos relacionados con el tratamiento	3(3)	2(2)	-
Exitus relacionados con el tratamiento	2(2)	2(2)	-
Exitus totales	-	-	-
	1(1)	1(1)	-

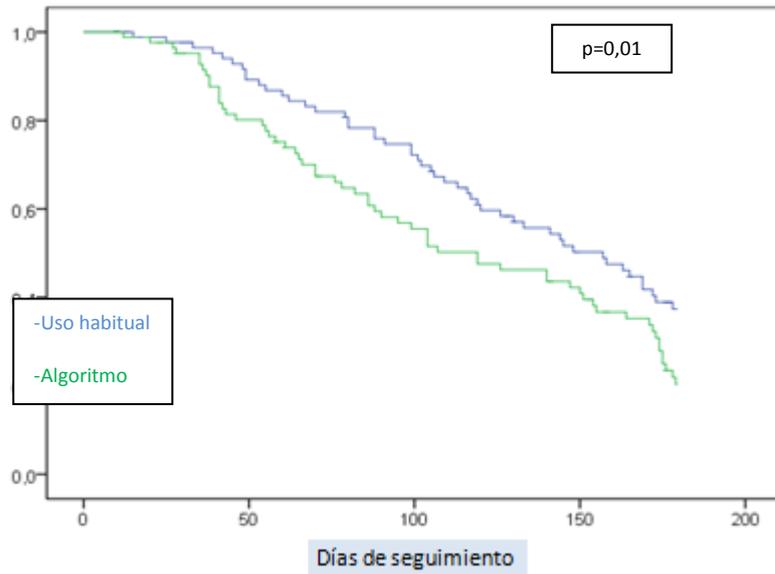
**Figura 4.** Porcentaje de pacientes que alcanzan la dosis estable.



**Figura 5.** Mediana de días necesarios hasta alcanzar la dosis estable.

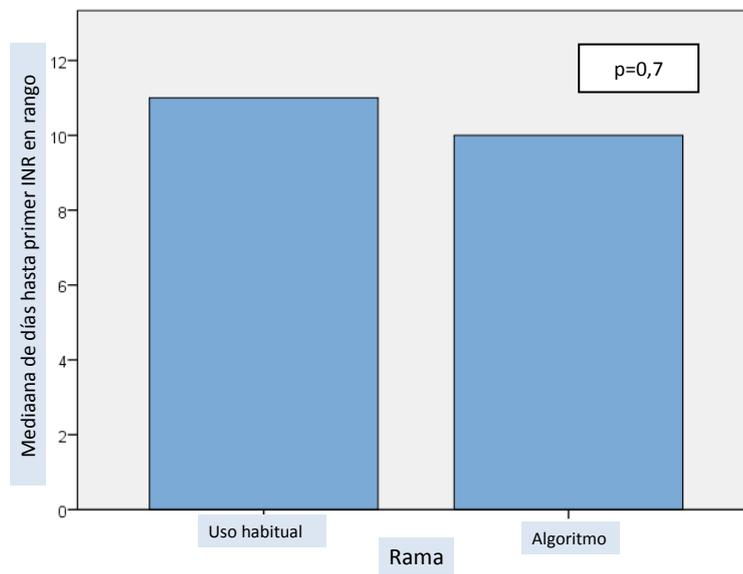


**Figura 6.** Tiempo para alcanzar la dosis estable durante los 6 meses de seguimiento.  
Análisis de Kaplan-

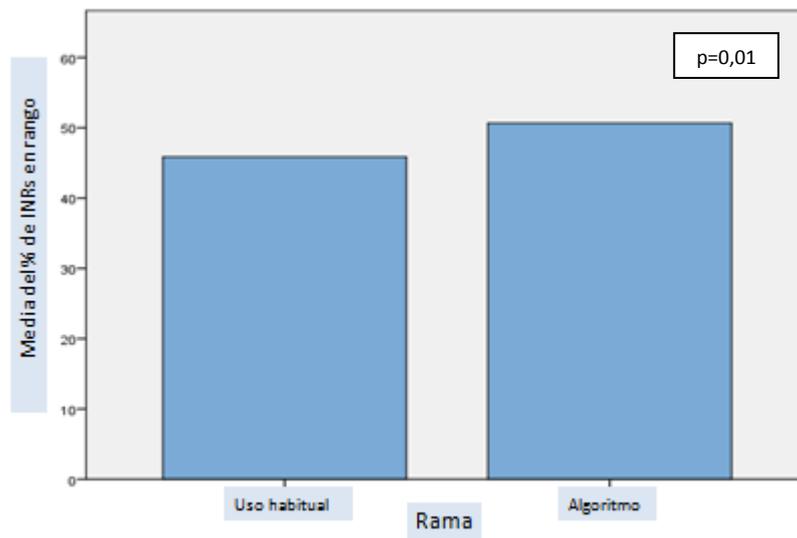


Meier.

**Figura 7.** Mediana de días hasta alcanzar el primer INR en rango(2-3)



**Figura 8.** Porcentaje de INRs en rango terapéutico por paciente.



**Tabla 3.** Resumen de los principales resultados de la comparación de la dosificación tradicional vs dosificación guiada por los genotipos

Objetivo	Clínica(n=92)	Algoritmo(n=88)	p
Pacientes con dosis estable, N (%) (3 meses)	23(25)	34(38)	0.049
Pacientes con dosis estable, N (%) (6 meses)	66(73)	72(81)	0.070
Días a dosis estable (mediana).	123	95	0.100
Días hasta el primer INR en rango (mediana)	11	10	0.700
% INRs en rango por paciente	45	50	0.010
INR>4, N (%) (6 meses)	27(30)	34(38)	0.300
Eventos, N (%)* (6 meses)	15(16)	10(11)	0.240

\*Incluye eventos mayores, menores, ingresos y éxitos relacionados con el tratamiento

## **ANEXO 2: RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS**

1. URL:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064469>

**PLOS ONE** (eISSN-1.932-6203) es una revista revisada por expertos, de libre acceso, para la publicación internacional. JCI=3.730. (Primer decil, 7/56 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES). U.S. Headquarters 1160 Battery Street Koshland Building East, Ste. 100 San Francisco, USA.

I. Anton AI, **Cerezo-Manchado JJ**, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, Roldan V & Gonzalez-Conejero R: *Novel associations of VKORC1 variants with higher acenocoumarol requirements*. PLoS One 2013 May 17;8(5):e64469. (JCI=3.730).

**Abstract**

Antecedentes: Los algoritmos que combinan los datos clínicos y genéticos han sido desarrollados para mejorar la terapia anticoagulante oral. Tres polimorfismos en dos genes , VKORC1 y CYP2C9 , son los principales determinantes de dosis cumarina y polimorfismos adicionales de importancia farmacogenética en cuestión no han sido identificados. Objetivos : Identificar nuevas variaciones genéticas en VKORC1 pertinente para la terapia anticoagulante oral. Métodos y Resultados: 3.949 pacientes consecutivos que toman acenocoumarol fueron genotipo para las rs9923231 VKORC1 y CY2C9 \* polimorfismos. De éstos , se seleccionaron 145 pacientes con una dosis fuera del rango esperado para el perfil genético determinado por estos polimorfismos . Factores clínicos explican el fenotipo en 88 pacientes. En los 57 pacientes restantes , todos con dosis más altas de lo esperado , se secuenció el gen VKORC1 y se identificaron los cambios genéticos en 14 pacientes. Cuatro pacientes llevaron a variantes de VKORC1 anteriormente relacionada con dosis altas de cumarina ( L128R , n = 1 y D36Y , N = 3 ) También se han detectado tres polimorfismos : . Rs17878544 ( N = 5 ) , rs55894764 ( N = 4 ) y rs7200749 ( N = 2 ) , que estaba en la vinculación de equilibrio con rs17878544 . Por último , 2 pacientes habían perdido la vinculación rs9923231/rs9934438 . La prevalencia de estas variaciones fue mayor en estos pacientes que en toda la muestra. Análisis de regresión lineal multivariante reveló que sólo D36Y y rs55894764 variantes afecta significativamente a la dosis , a pesar de la mejora en el modelo de predicción es pequeño ( del 39% al 40 % ) . Conclusión : Nuestra estrategia identifica nuevas asociaciones de VKORC1 variantes con dosis más altas acenocoumarol aunque con un bajo tamaño de efecto . Son necesarios más

estudios para probar su influencia en la función de VKORC1 y el costo / beneficio de su inclusión en los algoritmos de farmacogenética .

## 2. (In Press)

**Pharmacogenomics** (ISSN 1462-2416) es una revista revisada por investigadores estrechamente involucrados en esta área de rápido desarrollo. (Primer cuartil, 47/261 PHARMACOLOGY & PHARMACY). JCI=3.857. Future Medicine Ltd, Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK. England & Wales.

II. **Cerezo-Manchado JJ**, Roldán V, Rosafalco M, Antón AI, Arroyo AB, Garcia-Barberá N, Martínez AB, Padilla J, Corral J, Vicente V & González-Conejero R. *Effect of VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic variants in early outcomes during acenocoumarol treatment*. *Pharmacogenomics* 2014, in press: (JCI=3.857).

### Abstract

Objetivo: Analizar VKORC1, CYP2C9 y CYP4F2 polimorfismos en relación con los principales resultados en las primeras etapas de la terapia de acenocoumarol. Pacientes y métodos: En retrospectiva, 941 pacientes que habían comenzado la terapia y en los que el tiempo de dosificación estable, se analizaron el momento de la anticoagulación excesiva y los eventos adversos durante 3 primeros meses. Resultados: los pacientes VKORC1 A> Un necesitan menos días para alcanzar la dosis estable ( $p = 0,017$ ). INR> 2,5 a las 72 h, y VKORC1 y genotipos CYP2C9 acondicionado exceso de anticoagulación ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$  y  $p < 0,001$ , respectivamente), mientras que los transportistas CYP4F2 T tenían un bajo riesgo de la misma ( $p = 0,009$ ). En cuanto a los genotipos combinados, CYP4F2 tuvo un efecto significativo sobre la sobre-anticoagulación al comienzo de la terapia con excepción de VKORC1 A> A y CYP2C9 \* 3 combinación.

Conclusiones: Además de VKORC1 y CYP2C9, CYP4F2 tiene un papel más ligero pero significativo en sobre-anticoagulación al comienzo de la terapia acenocumarol

**3. URL: <http://dx.doi.org/10.1160/TH12-08-0631>**

**Thrombosis and Haemostasis** (ISSN 0340–6245) publica artículos sobre investigación básica y clínica en cualquier área de la trombosis y hemostasia. JCI=6.094. (Primer decil, 6/67, HEMATOLOGY). Schattauer Publishers, Stuttgart.

III. **Cerezo-Manchado JJ**, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martínez AB, Corral J, Vicente V, González-Conejero R, Roldán V.: *Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose*. *Thromb Haemost.* 2013 Jan;109(1):146-53 (JCI=6.094).

**Abstract**

Acenocumarol es un fármaco anticoagulante comúnmente prescrita para la profilaxis y tratamiento de trastornos tromboembólicos venosos y arteriales en varios países. En contrapartida de la warfarina , hay escasa información sobre los algoritmos de farmacogenética para la estimación de la dosis acenocumarol constante. El objetivo de este estudio fue desarrollar un algoritmo de predicción para el acenocumarol . El algoritmo se ha creado

utilizando los datos de 973 pacientes anticoagulados retrospectivamente seleccionadas y fue validado en una segunda cohorte independiente que suman 2.683 pacientes. El mejor modelo de regresión para predecir la dosis estable de la cohorte primaria incluyó factores clínicos (edad e índice de masa corporal , BSA ) y las variantes genéticas ( VKORC1 , CYP2C9 \* y CYP4F2 polimorfismos ) y explica hasta el 50 % de la dosis estable. En la validación

estudiar el algoritmo clínico produjo un  $R^2$  ajustado = 0,15 ( error estándar de estimación = 4,5 ) y el enfoque genético mejoró la dosis previstas, hasta 30 % ( error estándar de estimación = 4,6 ) . Una vez más, el mejor modelo combina factores clínicos y genéticos (  $R^2$  = 0,48 ; error estándar de la estimación = 4 ) que proporcionaron los mejores resultados de las dosis estimaciones dentro del 20 % de la dosis real en los pacientes que toman más bajo (  $\leq 7$ mg/week ) o más altas (  $\geq 25$ mg/week ) dosis acenocumarol . En conclusión , hemos desarrollado un algoritmo de predicción a partir de datos clínicos y tres polimorfismos en VKORC1 , CYP2C9 \* y los genes CYP4F2 que proporcionó una dosis acenocumarol estable alrededor del 50 % de los pacientes en la cohorte de validación . Tal algoritmo era especialmente útil para los pacientes que necesitan mayores o dosis más bajas acenocumarol , aquellos pacientes con un mayor tiempo requerido hasta su estabilización y son más propensos a sufrir una complicación derivada del tratamiento.

