

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología y Terapéutica



**INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ACENOCUMAROL:
DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS FARMACOGENÉTICOS Y SU
VALIDACIÓN EN ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.**

TESIS DOCTORAL

HOI YAN TONG
MADRID, 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Farmacología y Terapéutica



**INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ACENOCUMAROL:
DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS FARMACOGENÉTICOS Y SU
VALIDACIÓN EN ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.**

Memoria para optar al título de Doctor en Medicina presentada por:

Dña. Hoi Yan Tong

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

DIRECTORES DE TESIS:

Prof. Dr. Antonio J. Carcas Sansuán

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

Dr. Alberto Borobia Pérez

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

MADRID, OCTUBRE DE 2021

D. ANTONIO J. CARCAS SANSUAN, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

INFORMA:

Que Dña. **HOI YAN TONG** ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral “INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ACENOCUMAROL: DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS FARMACOGENÉTICOS Y SU VALIDACIÓN EN ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.”

D. ALBERTO BOROBIA PÉREZ, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

INFORMA:

Que Dña. **HOI YAN TONG** ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral “INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ACENOCUMAROL: DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS FARMACOGENÉTICOS Y SU VALIDACIÓN EN ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.”

A mis padres, por su cariño y toda una vida de entrega

A mi hija Emma, por la fuerza que me das

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a quienes quiero agradecer, empezando por el Dr. Antonio Carcas, director de esta tesis doctoral. Gracias por su enseñanza, guía, entusiasmo, paciencia y confianza para llevar adelante este proyecto.

Al Dr. Alberto Borobia, co-director de esta tesis doctoral, por ser pilar importante de este proyecto. Gracias por ser ejemplo de constancia y por su apoyo en todo momento.

Al Dr. Jesús Frías, Jefe del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario La Paz, por ser ejemplo de profesionalidad y por su apoyo incondicional.

A todo el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario La Paz por haber sido una extensión de mi familia. Ha sido un verdadero privilegio haber trabajado a lado de grandes profesionales y mejores personas.

A mis padres y hermano claramente sin ellos no estaría donde estoy ahora; gracias por apoyarme en todo y por confiar en mí.

A Lesbia y Wing Yee por estar siempre cerca y apoyarme en todo.

A Barish, simplemente gracia por tu apoyo.

A mi hija Emma, gracias por ser una maravillosa hija, espero ser un ejemplo a seguir para ti.

A todas las personas que de alguna forma ha formado parte de esta aventura!

RESUMEN

OBJETIVOS GENERALES: (1) Desarrollo de un modelo predictivo de la dosis estable de acenocumarol en diversas patologías. (2) Validación prospectiva de un algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.

MÉTODOS y RESULTADOS: En esta tesis doctoral se incluyen 3 estudios propios y un metaanálisis colaborativo internacional. Todos los estudios han sido aprobados por las autoridades reguladoras pertinentes y acorde a cada tipo de estudio.

1. Nuevo algoritmo farmacogenético de predicción de dosis en acenocumarol para obtener una anticoagulación estable en una población española con diversas patologías que requiera anticoagulación con acenocumarol.

Se reclutaron 685 pacientes en 2 hospitales españolas y 1 centro de atención primaria. Se eligió al azar el 80% de los pacientes (n = 556), considerando una distribución equitativa de genotipos para conformar la cohorte de generación del algoritmo. El 20% restante (n = 129) formó la cohorte de validación. Se utilizó un modelo de regresión lineal múltiple para generar el algoritmo utilizando la dosis estable de acenocumarol como variable dependiente y las variables clínicas y genotípicas como variables independientes. Las variables incluidas en el algoritmo fueron la edad, el peso, el uso de amiodarona, el estado de inductor enzimático, el rango objetivo de la razón internacional normalizada (INR) y la presencia de CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), VKORC1 (rs9923231) y CYP4F2 (rs2108622).

El coeficiente de determinación (R^2) explicado por el algoritmo fue del 52,8% en la cohorte de generación y del 64% en la cohorte de validación. Según el tipo de patología, las R^2 fueron: fibrilación auricular, 57,4%; sustitución valvular, 56,3%; y enfermedad tromboembólica venosa, 51,5%. Se clasificó a los pacientes en 3 grupos según la dosis estable (<11 mg/semana, 11-21 mg/semana, >21 mg/semana), el porcentaje de pacientes correctamente clasificados fue mayor en el grupo intermedio, mientras que la diferencia entre los algoritmos farmacogenético y clínico aumentó en los grupos de dosis extremas.

2. Evaluación de la posible influencia de 2 polimorfismos del POR (POR*28 y rs2868177) en la dosis estable de acenocumarol.

Estudio observacional y transversal. Se reclutaron pacientes en anticoagulación estable con acenocumarol desde el Hospital Universitario La Paz y un Centro de Atención Primaria. Los datos obtenidos incluían la edad, el sexo, la raza, peso y estatura, los resultados del INR, dosis de acenocumarol en los últimos 3 meses y la medicación concomitante (amiodarona y estado del

inductor enzimático). Se recogió una muestra de sangre para la determinación de CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, APOE y dos variantes del genotipo POR. Para evaluar la influencia del POR se utilizó el último algoritmo farmacogenético previamente diseñado.

Se reclutaron 340 pacientes. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 51,5% con un criterio de información de Akaike de 234,22. La inclusión de los polimorfismos del POR*28 aumentó la R^2 al 52,0% y redujo el criterio de información de Akaike a 230,58. El POR*28 heterocigoto mostró significación estadística en el algoritmo.

3. Influencia del CYP4F2, VKORC1 y CYP2C9 en la dosis de cumarina: un metaanálisis de datos de pacientes individuales en más de 15.000 individuos.

Se incorporó un total de 15.754 pacientes de 38 estudios. Se solicitó a los autores de estos estudios los siguientes datos de sus pacientes: sexo, edad, etnia, genotipos, indicación de tratamiento con cumarina, INR objetivo, tipo de cumarina utilizada y dosis de mantenimiento. Y otros datos adicionales como peso, estatura y uso de fármacos concomitantes cuando se disponían de ellos.

La diferencia en la dosis logarítmica de cumarina para los sujetos con al menos un alelo T (CT + TT) del CYP4F2 en comparación con los sujetos de tipo salvaje (CC) fue de 0,09 (IC 95%: 0,07-0,10), lo que corresponde a un aumento del 9 % en mg/semana (IC del 95%: 7-10%).

4. Ensayo clínico para la evaluación de la efectividad y seguridad del uso de un algoritmo de dosificación de acenocumarol que incorpora variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa.

Ensayo clínico aleatorizado, multicéntrico que evaluó la eficacia de un algoritmo farmacogenético de dosificación frente a un ajuste de dosis estándar al inicio del tratamiento con acenocumarol. Se incluyeron 144 pacientes con enfermedad tromboembólica venosa. El día del reclutamiento, se obtuvo una muestra de sangre para la determinación del genotipo (CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2, APOE). El ajuste de dosis se realizó el día 3 o 4 después del inicio del tratamiento, según el grupo asignado, se hizo seguimiento durante 12 semanas. La variable principal fue el porcentaje de pacientes con un INR dentro del rango terapéutico en el día 7 de tratamiento.

Treinta y cuatro (47,2%) pacientes tenían un INR dentro del rango terapéutico en el día 7 después del inicio del tratamiento en el grupo guiado por el genotipo en comparación con 14 (21,9%) en el grupo de control ($p = 0,0023$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo para lograr un INR estable, el número de INR dentro del rango en las primeras 6 semanas y al final del estudio.

CONCLUSIONES: Los polimorfismos de los tres genes estudiados (CYP2C9, VKORC1 y CYP4F2) añadidos a variables demográficas-clínicas, contribuyen a predecir la dosis de acenocumarol para obtener un INR estable en una cohorte de pacientes con diversas patologías, logrando explicar un 52.8% de la variabilidad en los requerimientos de dosis de acenocumarol. El POR*28 heterocigoto tuvo una asociación estadísticamente significativa, sin embargo, su contribución a la capacidad predictiva del algoritmo es baja. El polimorfismo CYP4F2*3 influye en los requerimientos de dosis de acenocumarol, incrementando la dosis semanal en un 9%. La realización del ensayo clínico permitió validar el algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, habiéndose mostrado efectivo para obtener más precozmente un INR dentro del rango terapéutico, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en términos de acontecimientos adversos clínicos relevantes en comparación con la práctica clínica habitual.

Tabla de contenido

1. ABREVIATURAS.....	12
2. INTRODUCCIÓN	15
2.1 Factores que determinan la respuesta a los fármacos.	15
2.2 Medicina Personalizada de Precisión (MPP).....	17
2.3 Farmacogenética / farmacogenómica dentro de la MPP	18
2.4 El descubrimiento y validación de los marcadores farmacogenéticos	25
2.5 Farmacogenética de los anticoagulantes orales	27
2.6 Marcadores farmacogenético de los AVKs	29
2.7 Algoritmos de dosificación de acenocumarol guiada por el genotipo.....	32
2.8 Eficacia de los algoritmos farmacogenéticos: ensayos clínicos	36
2.9 Antecedentes.....	39
3. HIPÓTESIS.....	42
3.1 General:.....	42
3.2 Específicas:	42
4. OBJETIVOS	44
4.1 Objetivos generales:.....	44
4.2 Objetivos específicos	44
5. PACIENTES Y MÉTODOS.....	46
5.1 Artículos publicados	47
6. RESULTADOS.....	51
6.1 Diseñar y validar un nuevo algoritmo farmacogenético en una cohorte de pacientes con diversas patologías que requiera anticoagulación con acenocumarol.....	51
6.2 Evaluación de la posible influencia de 2 polimorfismos del POR (POR*28 y rs2868177) en la dosis estable de acenocumarol.....	61
6.3 Influencia del CYP4F2, VKORC1 y CYP2C9 en la dosis de cumarina: un metaanálisis de datos de pacientes individuales en más de 15.000 individuos.	69
6.4 Ensayo clínico para la evaluación de la efectividad y seguridad del uso de un algoritmo de dosificación de Acenocumarol que incorpora variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa.....	72
7. DISCUSIÓN	83
8. CONCLUSIONES	94
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS

Lista de tablas

Tabla 1. Factores que influyen en la variabilidad de la respuesta terapéutica	15
Tabla 2. Fármacos en los que existe alguna recomendación por parte del CPIC, DPWG y CPNDS	20
Tabla 3. Listado de medicamentos con requerimiento de prueba genética en distintas agencias reguladoras.	22
Tabla 4. Algoritmos de dosificación de acenocumarol con las variables clínica y genéticas..	35
Tabla 5. Principales ensayos clínicos con warfarina	37
Tabla 6. Características de los pacientes en las cohortes de generación (n=556) y validación (n=129)	55
Tabla 7. Características de los pacientes según enfermedad.	56
Tabla 8. Algoritmos farmacogenético y clínico en la cohorte de generación	57
Tabla 9. Rendimiento predictivo de los algoritmos farmacogenéticos y clínicos en las cohorte de generación, validación y completa.	58
Tabla 10. Rendimiento predictivo del algoritmo farmacogenético por enfermedad en la cohorte completa.	59
Tabla 11. Pacientes correctamente clasificados (dosis predicha dentro del \pm 20% de la dosis real) en los algoritmos farmacogenético y clínico en las cohortes de generación, validación y completa.	59
Tabla 12. Pacientes correctamente clasificados por grupos de dosis (dosis predicha dentro del \pm 20% de la dosis real) y MAE de la cohorte completa, según los algoritmos farmacogenético y clínico.	60
Tabla 13. Características demográficas, clínicas y genotipo de los pacientes incluidos.....	64
Tabla 14. Efecto del POR*28 sobre las variantes del CYP2C9 en la dosis real de acenocumarol. Análisis univariante.	65
Tabla 15. Efecto del POR rs2868177 sobre las variantes del CYP2C9 en la dosis real de acenocumarol. Análisis univariante	66
Tabla 16. Análisis de regresión multivariante utilizando las mismas variables incluidas en el algoritmo farmacogenético añadiendo variantes del POR*28.	67
Tabla 17. Análisis de regresión multivariante utilizando las mismas variables incluidas en el algoritmo farmacogenético añadiendo variantes del POR (rs2868177).....	67

Tabla 18. Porcentaje de pacientes correctamente clasificados de acuerdo con el fenotipo (dosis predicha dentro del \pm 20% de la dosis actual), utilizando el algoritmo farmacogenético incluyendo y sin incluir los polimorfismos del POR*28	68
Tabla 19. Procedimientos del estudio.....	74
Tabla 20. Datos basales de los pacientes incluidos	78
Tabla 21. Análisis de seguridad	81

Lista de figuras

Figura 1. Representación farmacocinética y farmacodinámica de acenocumarol	29
Figura 2. Cronograma completo del proyecto	40
Figura 3. Diagrama de bosque para la diferencia en el logaritmo de la dosis estable de cumarina* para los sujetos con polimorfismo del CYP4F2 (CT + TT) en comparación con los sujetos con CYP4F2 de tipo salvaje (CC), según el modelo dominante.....	71
Figura 4. Diagrama de flujo de pacientes incluidos	78
Figura 5. Porcentaje de pacientes con INR dentro del rango terapéutico por visita programada.	80

ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

ACOD: Anticoagulante Oral de Acción Directa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AIC: Criterio de información de Akaike

ApoE: Apolipoproteína E

ARN: Ácido Ribonucleico

AVK: Antagonistas de la Vitamina K

CD: Cohorte de Derivación

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CEIm: Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium

CPNDS: Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety

CRD: Cuaderno de Recogida de Datos

CYP2C9: Isoforma 2C9 del citocromo P450

CYP4F2: Isoforma 4F2 del citocromo P450

CYP3A5: Isoforma 3A5 del citocromo P450

DE: Desviación estándar

DPWG: Dutch Pharmacogenetics Working Group

EA: Evento Adverso

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: European Medicines Agency

ETE: Enfermedad Tromboembólica Venosa

FA: Fibrilación Auricular

FDA: Food and Drug Administration

GGCX: Gamma-glutamyl carboxilasa

GWAS: Genome-wide association study

HBPM: Heparina de bajo peso molecular

HCSC: Health Canada

HULP: Hospital Universitario La Paz

HUSC: Hospital Universitario San Cecilio

IC: Intervalo de confianza

ICH: International Council for Harmonisation

IMC: Índice de masa corporal

INR: International normalized ratio

ITT: Intención de tratar

IWPC: International Warfarin Pharmacogenetics Consortium

MAE: Error absoluto medio

ME: Error medio

MPP: Medicina Personalizada de Precisión

NGS: Next-Generation sequencing

OE: Otras enfermedades

PGx: Farmacogenético

PharmGKB: Pharmacogenomics Knowledge Base

POR: P450 oxidorreductasa

PP: Población por protocolo

R²: Coeficiente de determinación

RNPGx: French National Network (Réseau) of Pharmacogenetics

RV: Reemplazo Valvular

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TEP: Tromboembolismo Pulmonar

TTR: Tiempo dentro del rango terapéutico

TVP: Trombosis Venosa Profunda

VKORC1: Complejo 1 de la Vitamina K Epóxido Reductasa

2. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que la respuesta clínica a la administración de un fármaco varía entre un paciente y otro. Estas variaciones pueden ser a nivel farmacodinámico, lo que implica que a concentraciones iguales de fármaco la respuesta a nivel del receptor presente diferencias interindividuales, o también se puede encontrar variabilidad en la respuesta farmacocinética, lo cual lleva que pacientes que reciben la misma dosis de un fármaco presenten variabilidad en las concentraciones a nivel sistémico. La mayor parte de la variabilidad interindividual tiene su origen en la respuesta farmacocinética. En general, la variabilidad se debe a las diferencias interindividuales en las tasas de absorción, distribución y eliminación del fármaco, ya sea por metabolismo o excreción (1-3).

La variabilidad de la respuesta a un fármaco también puede ser como consecuencia de una serie de interacciones farmacológicas que pueden influir en los parámetros farmacocinéticos.

La respuesta farmacológica puede optimizarse para adaptarse a las variables que influyen en la variabilidad interindividual. Esta optimización puede ser a través de la selección adecuada del medicamento que *a priori* va a ser más eficaz en el paciente, o también mediante la individualización de la dosis o evitar el uso concomitante de otros fármacos que puedan interaccionar.

2.1 Factores que determinan la respuesta a los fármacos.

Se han descrito una amplia lista de factores que pueden influir en la variabilidad de la respuesta a los fármacos. Pudiendo agruparse en factores demográficos, como la edad, el sexo, el peso, etc., factores clínicos como enfermedad de base, comorbilidades, función renal y medicamentos concomitantes, factores ambientales como la dieta y factores genéticos. Los efectos que producen estos factores sobre la variabilidad en la respuesta terapéutica se pueden ver resumido en la siguiente tabla (4-11).

Tabla 1. Factores que influyen en la variabilidad de la respuesta terapéutica

Factores	Efecto
Edad	Afecta especialmente a la farmacocinética y es más evidente en las edades extremas. Así, por ejemplo, los fármacos hidrosolubles

	<p>presentan un volumen de distribución mayor en los neonatos que en los adultos, debido a la mayor proporción de agua por kilogramo de peso corporal. Por el contrario, el volumen de distribución de los fármacos liposolubles es mayor en los ancianos. La edad también afecta a la unión a la albúmina, la cual está reducida en los neonatos y en los ancianos.</p> <p>La edad también afecta al metabolismo hepático de los fármacos. Al nacer, la mayoría de las enzimas que metabolizan los fármacos están presentes, pero la actividad de muchos sistemas enzimáticos es baja, pudiendo producirse una acumulación de fármacos y toxicidad. Por el contrario, los pacientes de edad avanzada a menudo no es necesario reducir la dosis de los fármacos que se eliminan por el metabolismo hepático, a menos que intervengan otros factores, por ejemplo, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática o interacciones farmacológicas.</p>
Sexo	<p>Las diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre ambos sexos podrían deberse al contenido de agua y grasa corporal. Diferencias en el tamaño corporal implica un mayor volumen de distribución y aclaramiento en los hombres, sin embargo, las mujeres presentan en general mayor cantidad de grasa corporal, pudiendo aumentar el volumen de distribución de los fármacos lipofílicos.</p>
Peso	<p>La dosis de muchos fármacos se basa en el peso corporal del paciente.</p> <p>La obesidad afecta de forma importante la farmacocinética. Esta lleva a un aumento en el porcentaje de tejido adiposo y reducción en el porcentaje de tejido magro y de agua. Así mismo, presentan un aumento en la volemia y del gasto cardíaco y aumento en la filtración glomerular, con el consiguiente aumento en el aclaramiento renal.</p>
Función hepática	<p>La disfunción hepática podría reducir el aclaramiento de fármacos eliminados por metabolismo hepático o por excreción biliar. También puede verse afectada la unión a proteínas plasmáticas, lo</p>

	que podría influir en la distribución y eliminación del fármaco. En la cirrosis hepática puede disminuir de forma importante la eliminación pre-sistémica, es decir, el efecto de primer paso, lo que conduce a un aumento del grado de absorción.
Función renal	La excreción renal de fármacos está controlada principalmente por tres factores: la filtración glomerular, la secreción tubular y la reabsorción tubular. Los factores que afectan a la excreción renal de los fármacos son: la función renal, la fijación de las proteínas, el pH de la orina y el flujo urinario. El deterioro de la función renal puede conducir a una acumulación clínicamente significativa de fármacos eliminados por los riñones.
Interacción medicamentosa	Muchas de las interacciones clínicamente significativas entre fármacos tienen un origen farmacocinético, a menudo debido a la inducción o inhibición de enzimas metabolizadoras o proteínas transportadoras.
Factores genéticos	Los polimorfismos genéticos que conducen a la producción de isoenzimas con actividad reducida o nula, o a la existencia de múltiples copias de una enzima con actividad elevada, contribuyen en gran medida a la variabilidad de las necesidades de dosis de los fármacos que se eliminan por metabolismo hepático. El cribado genético podrá utilizarse para ayudar a determinar las dosis iniciales de los fármacos para los que se ha caracterizado la variabilidad de la farmacocinética determinada genéticamente.

2.2 Medicina Personalizada de Precisión (MPP)

Históricamente, la medicina, y especialmente la Farmacología Clínica, se ha preocupado de conseguir una individualización de los tratamientos farmacológicos. Así, algunos medicamentos se dosifican de forma individualizada en función de la edad, el peso, las comorbilidades entre otros parámetros demográficos y clínicos. Sin embargo, de forma general, la tendencia en la práctica clínica lo que realmente ocurre es que se sigue un patrón de “talla única”. El término MPP suele utilizarse para indicar un tratamiento dirigido basado en ciertas características individuales de los pacientes. Si bien es cierto que se relaciona la MPP con el

uso de biomarcadores individuales específicos como aquellos determinados genéticamente, es importante tener en cuenta también los factores relacionados con las características demográficas observables y las relacionadas con otros tratamientos farmacológicos (12).

La MPP ha tenido un importante avance en los últimos años gracias al desarrollo tecnológico, tal como el uso de la secuenciación masiva de alto rendimiento, la espectrometría de masas, o las técnicas de imagen, entre otras, permitiendo realizar múltiples análisis complejos en muestras clínicas, siendo incorporados en el proceso de selección del tratamiento óptimo en la dosis adecuada individualizada a cada paciente.

Gracias a estas tecnologías se puede tener una imagen cada vez más detallada de las alteraciones moleculares y celulares que subyacen a numerosas enfermedades y han revelado una enorme variabilidad entre pacientes. Estos hallazgos han permitido que se pueda tener un enfoque más personalizado de la medicina, en el que los marcadores moleculares y celulares ayudan a adaptar el tratamiento a cada individuo (2).

Los polimorfismos genéticos, los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son los determinantes genéticos más comunes en la terapia individualizada. Se tratan de cambios mínimos en la información genética, que está presente en más del 1% de la población. Son considerados variantes normales, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, pueden llegar a tener un impacto fenotípico. La gran mayoría de los SNPs son funcionalmente silenciosos, ya que se encuentran en regiones no codificantes o no reguladoras del genoma, sin embargo, algunos de los SNPs conducen a una estructura o expresión proteica alterada (13).

La correcta aplicación de la medicina personalizada basada en biomarcadores exige una creciente interacción entre el laboratorio y el personal clínico. Para su aplicación es necesario un equipo coordinado compuesto por investigadores básicos y médicos altamente especializados en sus áreas (14).

2.3 Farmacogenética / farmacogenómica dentro de la MPP

Tras años sin consenso en cuanto a la definición de ambos términos, en el año 2007 la Conferencia Internacional de Harmonización - ICH publicó una guía en donde los conceptualiza. La farmacogenética se encarga del estudio de la influencia que ejercen las variaciones en la secuencia de ADN en relación a la respuesta a un fármaco, mientras que la farmacogenómica, estudia tanto las variaciones en el ADN como en el ARN, es decir, estudia

tanto variaciones en el ADN como de los cambios en la expresión génica en respuesta a un tratamiento farmacológico (15).

Los genes que subyacen a las diferencias en la respuesta a los fármacos pueden albergar variantes genéticas relacionadas con la farmacocinética o la farmacodinámica de un fármaco. Esta variación puede influir, y por tanto predecir potencialmente, tanto la eficacia como la toxicidad, siendo una herramienta de gran valor en la MPP.

Los primeros éxitos de la farmacogenética han surgido en oncología, donde los cambios genéticos en el tumor de un paciente pueden aumentar o reprimir la expresión de los genes en comparación con los tejidos normales, pudiendo así ampliar el arsenal terapéutico. De esta forma, el análisis genético tumoral de un paciente puede ayudar a predecir el beneficio terapéutico -o la ausencia del mismo- de los fármacos, como el trastuzumab, el erlotinib o el imatinib. Las mutaciones somáticas en los tumores también pueden ayudar a predecir la resistencia, como las mutaciones activadoras de KRAS en el cáncer colorrectal, que se han establecido como un marcador predictivo de la resistencia a los anticuerpos específicos del EGFR, cetuximab y panitumumab (16).

La farmacogenética también ha tenido una amplia presencia en el estudio de los fármacos de tratamiento cardiovascular. La warfarina representa un ejemplo claro de cómo la información genética puede ayudar a personalizar la pauta de tratamiento de un paciente. El clopidogrel representa otro ejemplo ampliamente conocido de la aplicación de la farmacogenética. Los polimorfismos del gen CYP2C19, con pérdida parcial o total de su función, están relacionados con diferencias en la exposición al metabolito activo de clopidogrel. Concretamente, los polimorfismos *2 y *3 están relacionados con una disminución de la función enzimática y una reducción de la efectividad del clopidogrel (14).

El número de asociaciones farmacogenéticas ha aumentado constantemente a lo largo de los años. En la actualidad, la Pharmacogenomics Knowledge Base o PharmGKB (17) reporta más de 700 variantes genéticas relacionados con la respuesta a los medicamentos.

En los últimos años han surgido grupos que han publicado diversas guías con recomendaciones basadas en niveles de evidencia para múltiples asociaciones gen-fármaco. Existe cierta heterogeneidad entre estos grupos, por ejemplo, la metodología utilizada por cada grupo para agrupar los genes y/o fármacos es diferente y como se puede evidenciar en la tabla 1 las recomendaciones de acción a tomar también pueden diferir. Hasta julio de 2020, el Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) había revisado más de 100 pares gen-fármaco. De

estos, el DPWG considera que 60 pares presentan una interacción gen-fármaco que requiere una acción, entre las medidas que recomiendan están el ajuste de la dosis o la vigilancia estrecha de posibles efectos adversos (18). El Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) ha revisado más de 400 pares gen-fármaco y ha publicado recomendaciones sobre 106 pares gen-fármaco con evidencia suficiente para al menos una acción de prescripción (19), el Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety (CPNDS) recomienda sobre 13 pares gen-fármaco, y el French National Network (Réseau) of Pharmacogenetics (RNPGx) sobre 8 pares gen-fármaco (20).

Tabla 2. Fármacos en los que existe alguna recomendación por parte del CPIC, DPWG y CPNDS

Fármaco	Genes	Guía
abacavir	HLA-B	CPIC, DPWG
alopurinol	HLA-B	CPIC
amikacina	MT-RNR1	CPIC
amitriptilina	CYP2C19, CYP2D6	CPIC DPWG
aripiprazol	CYP2D6	DPWG
atazanavir	UGT1A1	CPIC
atomoxetina	CYP2D6	CPIC, DPWG
atorvastatina	SLCO1B1	DPWG
azatioprina	NUDT15, TPMT	CPIC, DPWG
Brexpiprazol	CYP2D6	DPWG
capecitabina	DPYD	CPIC, DPWG
carbamazepina	HLA-A, HLA-B	CPIC, CPNDS
celecoxib	CYP2C9	CPIC
cisplatino	TPMT	CPNDS
citalopram	CYP2C19	CPIC, DPWG
clomipramina	CYP2C19, CYP2D6	CPIC, DPWG
clopidogrel	CYP2C19	CPIC, DPWG
codeína	CYP2D6	CPIC, DPWG, CPNDS
daunorubicin	RARG, SLC28A3, UGT1A6	CPNDS
desfluran	CACNA1S, RYR1	CPIC
desipramina	CYP2D6	CPIC
dexlansoprazol	CYP2C19	CPIC
doxepin	CYP2C19, CYP2D6	CPIC, DPWG
doxorubicin	RARG, SLC28A3, UGT1A6	CPNDS
efavirenz	CYP2B6	CPIC, DPWG
eliglustat	CYP2D6	DPWG
enflurano	CACNA1S, RYR1	CPIC
escitalopram	CYP2C19	CPIC, DPWG
flecainida	CYP2D6	DPWG
flucloxacilina	HLA-B	DPWG
flucitosina	DPYD	DPWG
fluorouracilo	DPYD	CPIC, DPWG
flurbiprofen	CYP2C9	CPIC
fluvoxamina	CYP2D6	CPIC, DPWG
fosfenitoína	CYP2C9, HLA-B	CPIC
gentamicina	MT-RNR1	CPIC

Fármaco	Genes	Guía
haloperidol	CYP2D6	DPWG
halotano	CACNA1S, RYR1	CPIC
Anticonceptivos hormonales	F5	DPWG
imipramina	CYP2C19 CYP2D6	CPIC, DPWG
irinotecan	UGT1A1	DPWG
isoflurano	CACNA1S, RYR1	CPIC
ivacaftor	CFTR	CPIC
kanamicina	MT-RNR1	CPIC
lansoprazol	CYP2C19	CPIC, DPWG
lornoxicam	CYP2C9	CPIC
meloxicam	CYP2C9	CPIC
mercaptipurina	NUDT15, TPMT	CPIC, DPWG
metoxiflurano	CACNA1S, RYR1	CPIC
metoprolol	CYP2D6	DPWG
nortriptilina	CYP2D6	CPIC, DPWG
omeprazol	CYP2C19	CPIC, DPWG
ondansetron	CYP2D6	CPIC
oxcarbazepina	HLA-B	CPIC
pantoprazol	CYP2C19	CPIC, DPWG
paromomicina	MT-RNR1	CPIC
paroxetina	CYP2D6	CPIC, DPWG
peginterferon alfa-2a	IFNL3	CPIC
peginterferon alfa-2b	IFNL3	CPIC
fenprocumon	CYP2C9 VKORC1	DPWG
fenitoina	CYP2C9	CPIC, DPWG
pimozida	CYP2D6	DPWG
piroxicam	CYP2C9	CPIC
plazomicina	MT-RNR1	CPIC
propafenona	CYP2D6	DPWG
rasburicasa	G6PD	CPIC
ribavirina	IFNL3	CPIC
risperidona	CYP2D6	DPWG
sertralina	CYP2C19	CPIC, DPWG
sevoflurano	CACNA1S, RYR1	CPIC
simvastatina	SLCO1B1	CPIC, DPWG
siponimod	CYP2C9	DPWG
estreptomicina	MT-RNR1	CPIC
succinilcolina	CACNA1S, RYR1	CPIC
tacrolimus	CYP3A5	CPIC, DPWG
tamoxifen	CYP2D6	CPIC, DPWG, CPNDS
tegafur	DPYD	CPIC, DPWG
tenoxicam	CYP2C9	CPIC
tioguanina	NUDT15, TPMT	CPIC, DPWG
tobramicina	MT-RNR1	CPIC
tramadol	CYP2D6	CPIC, DPWG
trimipramina	CYP2C19, CYP2D6	CPIC
tropisetron	CYP2D6	CPIC
venlafaxina	CYP2D6	DPWG
voriconazol	CYP2C19	CPIC, DPWG
warfarina	CYP2C9, VKORC1	CPIC, DPWG, CPNDS
zuclopentixol	CYP2D6	DPWG

Se han realizado numerosos estudios evidenciando que muchas de las variaciones en los genes, son polimorfismos de una sola base (SNPs), los cuales influyen en la respuesta terapéutica, es decir, en su eficacia y seguridad. Algunas de estas variaciones han llegado a ser consideradas biomarcadores válidos por las principales agencias reguladoras.

El número de medicamentos con información farmacogenética en sus fichas técnica también ha aumentado a lo largo de los años debido, por un lado, a las evidencias existentes en donde se demuestra la utilidad de la inclusión de variantes genéticas y, por otro lado, a las directrices y políticas reguladoras actuales (21). Desde hace más de una década la FDA ha reconocido el valor de la información farmacogenética mediante la aprobación de ciertos medicamentos que reflejan la variación en la respuesta debida a factores genéticos. De esta forma, se ha añadido información farmacogenética a las fichas técnicas de warfarina, carbamazepina, etc. En cuanto a la EMA, las fichas técnicas de unos 150 fármacos aprobados por la Comisión Europea utilizados principalmente en oncología incluyen información farmacogenómica. La información farmacogenética es de especial importancia para los tratamientos en los que el índice terapéutico es estrecho y, por lo tanto, en los que una pequeña sobredosis supone un riesgo sustancialmente mayor de reacciones adversas.

En la siguiente tabla se muestra un listado de fármacos cuya ficha técnica de la FDA, EMA, Suecia o Canadá indica que debe realizarse algún tipo de prueba genética antes de utilizar el medicamento, pudiendo ser un requisito únicamente para un subconjunto particular de pacientes (17).

Tabla 3. Listado de medicamentos con requerimiento de prueba genética en distintas agencias reguladoras.

Fármaco	FDA	EMA	Swissmedic	HCSC
abacavir	√	√	√	√
abemaciclib	√	√		
acetaminophen/ codeine			√	
afatinib	√	√		√
alectinib	√	√		
alglucosidase alfa	√	√		√
alpelisib	√	√		√
anakinra	√			

Fármaco	FDA	EMA	Swissmedic	HCSC
anastrozol	√			√
Trióxido de arsenico	√	√		√
avapritinib	√			
avelumab	√			
bosutinib	√	√		√
brigatinib	√	√		
capmatinib	√			
carbamazepina	√		√	√
ácido carginico	√	√		√
ceritinib	√	√		√
alfa cerliponasa	√	√		
cetuximab	√	√		√
Ácido cólico	√	√		
cobimetinib	√	√		
crizotinib	√	√		√
dabrafenib	√	√		√
dacomitinib	√	√		
dasatinib	√	√		√
denileukina diftotox	√			
divalproex sodio	√			√
dolutegravir/ abacavir/ lamivudine			√	
dotatate lutetio Lu-177	√			
eculizumab	√			
elexacaftor/ tezacaftor/ ivacaftor	√			
alfa elosulfasa	√	√		
enasidenib	√			
encorafenib	√	√		
entrectinib	√			

Fármaco	FDA	EMA	Swissmedic	HCSC
erdafitinib	√			
eteplirsén	√			
everolimus	√	√		√
exemestane	√			√
fam-trastuzumab deruxtecán-nxki	√			
fulvestrant	√	√		
gemtuzumab ozogamicin	√			
gilteritinib	√			
golodirsén	√			
imatinib	√	√		√
inebilizumab- cdon	√			
ivacaftor	√	√		√
ivacaftor/ lumacaftor	√	√		
ivacaftor/ tezacaftor	√	√		
ivosidenib	√			
lamivudine/ abacavir			√	
larotrectinib sulfato	√			
lenvatinib	√			
letrozol	√			√
lonafarnib	√			
lumasiran	√			
margetuximab	√			
metreleptin	√			
migalastat	√	√		
niraparib	√			
osimertinib	√	√		
palbociclib	√	√		
panitumumab	√	√		√

Fármaco	FDA	EMA	Swissmedic	HCSC
pembrolizumab	√	√		
pertuzumab	√	√		√
pimozida	√			
ponatinib	√	√		√
pralsetinib	√			
ribociclib	√	√		
risdiplam	√			
selpercatinib	√			
setmelanotide	√			
siponimod	√			
sodium benzoate / sodium fenilacetate	√			
sotorasib	√			
tafenoquina	√			
talazoparib	√	√		
trametinib	√	√		√
trastuzumab emtansina	√	√		√
tretinoína	√			√
tucatinib	√			
alfa velaglucerase	√	√		√
vemurafenib	√	√		√
viltolarsen	√			
vincristina	√			
zidovudina/ lamivudina/ abacavir			√	

FDA: US Food and Drug Administration; EMA: European Medicines Agency; Swissmedic: Swiss Agency for Therapeutic Products; HCSC: Health Canada

2.4 El descubrimiento y validación de los marcadores farmacogenéticos

La identificación inicial de los genes candidatos se pueden obtener desde fuente bibliográfica, estudios previos, o puede tratarse de genes “*de novo*” obtenidos desde diferentes

enfoques. En esencia, se trata de buscar diferencias genéticas, proteicas o de metabolitos entre individuos con y sin una condición dada, que pudiera tener utilidad clínica.

Existen dos posibles enfoques para la identificación de posibles genes: (1) los estudios de genes candidatos, son los que llevan más tiempo aplicándose. Están dirigidos al estudio de unos pocos genes que se sabe están implicados en el metabolismo, transporte o respuesta del fármaco. Tienen la ventaja de ser relativamente económicos, son menos complejos en su interpretación permitiendo establecer la relación gen-fármaco, (2) el segundo enfoque son los estudios de asociación genómica (GWAS), estos estudios consideran todos los genes del genoma humano. Realiza un estudio de asociación del genoma completo de 2 grupos de pacientes según ciertos criterios fenotípicos, los casos y los controles. Tras genotipar ambos grupos, se comparan las frecuencias alélicas. Aquellos SNPs que resulten más frecuentes en los casos respecto a los controles son considerados SNPs candidatos. Como resultado, los estudios de genes candidatos tienen una mayor potencia estadística para detectar diferencias. También están inevitablemente sesgados hacia los genes y las vías biológicas de interés (22, 23).

Una cuestión importante en el uso de SNP dirigidos y en el estudio del genoma completo, es la detección limitada de variantes raras. Las variantes raras tienen bajos niveles de linkage disequilibrium por pares con las variantes comunes en las plataformas de SNP, con la consiguiente baja potencia para detectar señales de asociación. En la actualidad, la secuenciación de nueva generación (NGS), brinda la oportunidad de generar información sobre nuevas variantes comunes y raras, que podrían representar variantes abordables para fármacos nuevos o ya utilizados, superando varios sesgos en la determinación de los SNPs.

Mediante las tecnologías descrita anteriormente, la identificación comienza con una perspectiva muchas veces a ciegas en una población objetivo debido a un enfoque determinado. Un ejemplo sería aplicar un diseño de caso/control el cual compare pacientes que experimentan toxicidad a algún medicamento frente a controles emparejados tratados con el mismo medicamento sin clínica de toxicidad (23).

Como siguiente paso, las variantes genéticas seleccionadas deben someterse a una validación interna seguida de una validación externa en una serie independiente de pacientes. Los ensayos prospectivos a mayor escala en una población independiente podrían permitir la validación clínica de los biomarcadores, siendo el ensayo clínico el tipo de estudio que aporta mayor grado de evidencia. Los parámetros que hay que tener en cuenta para validar

completamente un biomarcador hasta su incorporación a la práctica clínica son: su eficacia, efectividad, su eficiencia, además del impacto económico y aspectos éticos de su uso.

2.5 Farmacogenética de los anticoagulantes orales

Los antagonistas de la vitamina K (AVK), han sido los anticoagulantes más prescritos para el tratamiento y la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes con fibrilación auricular (FA), trombosis venosa profunda (TVP) y reemplazos valvulares (RV), entre otras indicaciones (24).

Los AVK actúan inhibiendo el reciclaje de la forma reducida de la vitamina K que es necesaria como cofactor para la activación de los factores de coagulación II, VII, IX, X y las proteínas anticoagulantes C y S (25).

El acenocumarol es un derivado de la 4-hidroxycumarina, forma parte de los fármacos anticoagulantes orales. Es un antagonista de la vitamina K (clasificación ATC: B01AA), que impide la activación de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (II, VII, IX y X) y las proteínas C y S. Inhibe la quinona reductasa y la vitamina k-epóxido reductasa, enzimas encargadas de reducir el epóxido de la vitamina K (inactivo) a la hidroquinona (vitamina K activa). Esta última actúa como cofactor de la gammaglutamilcarboxilasa que carboxila los residuos de ácido glutámico de las proteínas (factores II, VII, IX, X y proteínas C y S) y los transforma en carboxiglutámico. Esta transformación dota a las proteínas de la capacidad de fijarse en la superficie de fosfolípidos si hay iones de calcio (26). Aunque el enantiómero S presenta mayor actividad, el efecto anticoagulante del acenocumarol depende principalmente del enantiómero R, debido a que el S-acenocumarol tiene una vida media más corta (1.8 horas), mientras que la vida media de eliminación del R-acenocumarol es de 6.6 horas (27).

A pesar de su gran eficacia, los AVK tienen una estrecha ventana terapéutica y una alta variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, debido principalmente a factores genéticos, a la presencia de fármacos concomitante, la dieta y a características generales (como la edad y peso) y clínicas del paciente. Estos factores dificultan la determinación de la dosis ideal de los AVKs para conseguir un tratamiento anticoagulante eficaz, (28). Por lo tanto, el mayor peligro de que un paciente no se encuentre adecuadamente anticoagulado radica en el hecho de que una dosis insuficiente o excesiva puede aumentar el riesgo de efectos secundarios, como eventos trombóticos o hemorrágicos, respectivamente, por

lo que se hace necesario supervisar periódicamente el tratamiento con acenocumarol. Se evalúa según el valor del cociente internacional normalizado (INR), un parámetro que cuantifica la actividad de coagulación a través del tiempo de protrombina. La terapia con acenocumarol se considera eficaz cuando los valores del INR alcanzan el rango terapéutico objetivo, que depende de la indicación terapéutica (29).

Con el fin de mejorar las limitaciones que presentan los AVK (estrecho margen terapéutico, inicio de acción lento, considerable variabilidad inter e intraindividual de la dosis, requerimiento de ajuste de la dosis de forma regular, además de la influencia de factores genéticos en el metabolismo, la dieta y un número elevado de interacciones medicamentosas), en los últimos 15 años se han ido introduciendo en la práctica clínica anticoagulantes orales de acción directa (ACOD) (25). A diferencia de los AVK, los mecanismos de acción de los ACOD consisten en la inhibición directa de las proteasas claves, los factores Xa y IIa, compitiendo por sus sitios de activación (30). Las principales indicaciones terapéuticas de los ACODs son la prevención y tratamiento de la TVP y tromboembolismo pulmonar (TEP), prevención de eventos tromboticos en pacientes con síndrome coronario agudo y FA. Sin embargo, a pesar de que los ACODs presentan importantes ventajas en comparación con el acenocumarol, tales como perfiles farmacocinéticos y dinámicos estables, menos interacciones farmacológicas y alimentarias, amplia ventana terapéutica, dosis fija y sin necesitar control periódico de las pruebas analíticas, también presentan importantes desventajas. Por ejemplo, los costes de los ACODs son mucho más elevados que los del acenocumarol. Los ACODs tienen vidas medias corta, que se presenta por un lado como una ventaja cuando por necesidad médica se requiere revertir la anticoagulación de una forma rápida, pero puede ser también una desventaja, por ejemplo, cuando el paciente se olvida tomar el tratamiento, pudiendo aumentar el riesgo de eventos tromboembólicos (31). Por otro lado, el hecho de no necesitar monitorización hace que se desconozca si el paciente realmente se encuentra anticoagulado, este hecho lo demostró el estudio REVERSE-AD, en donde se evaluó la eficacia de idarucizumab – el antídoto del dabigatrán - se vio que el 24 % de los pacientes con hemorragia grave en tratamiento con dabigatrán no tenían alterados los parámetros de coagulación (32).

A pesar de la aparición de los ACOD, en España el acenocumarol sigue siendo el anticoagulante más utilizado. Se estima que, de los pacientes anticoagulados en España, el 59% de ellos lo están con AVK. El uso de ACOD en España está muy por debajo de otros países en Europa, en donde su uso de calcula en torno al 68% frente a un 40% es España (33).

2.6 Marcadores farmacogenético de los AVKs

La dosis adecuada de warfarina varía en más de 10 veces entre los pacientes, y debido a su estrecho margen terapéutico, se hace necesario establecer la dosis correcta individualizada. Además de la dieta, los factores clínicos y las variables demográficas, se ha estudiado ampliamente las variantes genéticas de tres genes que contribuyen significativamente a la variabilidad de la respuesta de los pacientes a la warfarina y al acenocumarol (34-36) (1) de la familia del citocromo P450, el CYP2C9, (2) el complejo de la epóxido reductasa de la vitamina K, subunidad 1, el VKORC1, y (3) de la familia del citocromo P450, el CYP4F2. En el año 2009, el Consorcio Internacional de Farmacogenética de la Warfarina (IWPC) publicó un algoritmo farmacogenético en el que participó una cohorte de 5052 pacientes con el objetivo de predecir la dosis estable de warfarina demostrando que producía recomendaciones más cercanas a la dosis terapéutica estable requerida que las recomendadas por un algoritmo basado únicamente en variables clínicas o en una estrategia de dosis fija (37). Por su parte, Epstein, et al, informaron que el uso de información genética para la dosificación de la warfarina redujo el riesgo de hospitalización en los pacientes ambulatorios que iniciaban tratamiento en casi un tercio (38).

Numerosos estudios han demostrado que los polimorfismos VKORC1 y CYP2C9 son extremadamente relevantes para explicar la variabilidad de la dosis de acenocumarol entre los pacientes. Por lo tanto, conocer la información genética del paciente antes de iniciar el tratamiento puede ayudar a acortar el tiempo necesario para lograr una anticoagulación terapéutica óptima, minimizando el exceso o el déficit de dosis (39).

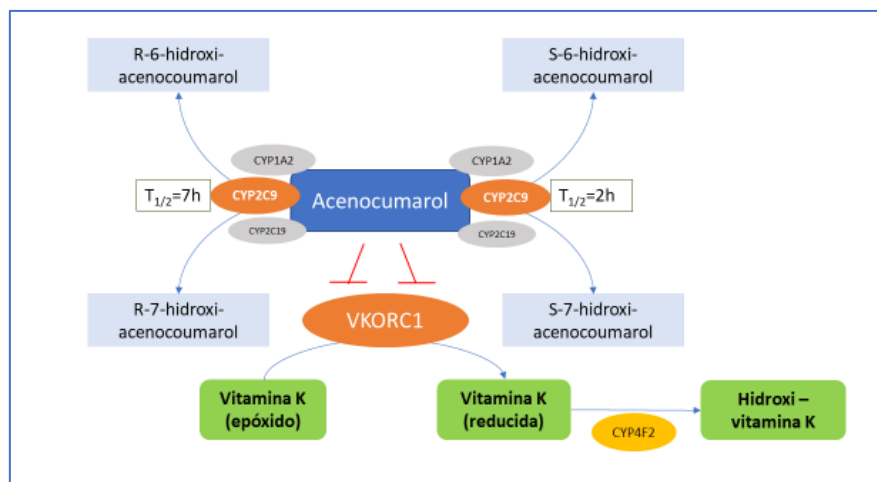


Figura 1. Representación farmacocinética y farmacodinámica de acenocumarol

VKORC1

El gen que codifica la enzima objetivo de los anticoagulantes orales cumarínicos, la subunidad C1 del complejo epóxido reductasa de la vitamina K (VKORC1), fue identificado en el año 2005. Desde entonces se han realizado numerosos estudios para determinar el efecto de los polimorfismos del VKORC1 sobre la dosis de los AVKs.

Los estudios demuestran que la presencia del SNP -1639G>A (rs9923231) en el gen VKORC1 que conduce a la sustitución del alelo wild type G por el alelo polimórfico A en la posición 1639 del promotor, se asocia con una mayor sensibilidad al acenocumarol (40). La inhibición irreversible del VKORC1 por los anticoagulantes orales bloquea la regeneración de la vitamina K, resultando en factores procoagulantes no funcionales.

Los estudios han demostrado que los grupos de haplotipos de VKORC1 pueden explicar en torno al 30-40% de la variabilidad de la dosis de acenocumarol en pacientes adultos, siendo los principales determinantes genéticos de la sensibilidad al acenocumarol (41).

La frecuencia de los haplotipos de VKORC1 difieren según los grupos étnicos. El grupo de haplotipos A es muy común en la población asiática (89%), no tan común en los caucásicos (37%) y aún menos en los descendientes de africanos (14%) (42). A este respecto, Soares et al. han demostrado que VKORC1 -1639G>A se distribuye según ascendencia genética, en un estudio que incluyó a 1038 sujetos de la población general brasileña, observaron que los genotipos GA y AA se encuentran con mayor frecuencia en personas con ascendencia europea (65 y 73%, respectivamente) que en los amerindios (24 y 21%) o en los de ascendencia africana (10 y 5%) (43).

CYP2C9

El CYP2C9 representa el 20-25% del citocromo P450 hepático, siendo una proteína que comprende 489 aminoácidos y cuyo gen se localiza en el cromosoma 10 (44). El CYP2C9 participa en el metabolismo de entre el 15-20% de los fármacos que se utilizan en la práctica clínica.

Se conoce que el gen que codifica el CYP2C9 es polimórfico y sus variantes se asocian a diferencias en la actividad enzimática del CYP2C9. Estudios realizados en diferentes grupos étnicos han revelado la existencia de diversas variantes alélicas del gen CYP2C9, como CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*4, CYP2C9*5, CYP2C9*6, y otras. De ellos, los más importantes en cuanto a su frecuencia en la población general son el CYP2C9*2 y el

CYP2C9*3. Ambos alelos se asocian a una marcada disminución de la actividad enzimática del CYP2C9, con aproximadamente un 12% de actividad enzimática residual en el caso del CYP2C9*2 y un 5% en el caso del CYP2C9*3 (45). Las variantes CYP2C9*2 y CYP2C9*3 son más comunes en los caucásicos, con frecuencias alélicas del 10-14% (CYP2C9*2) y del 8-10% (CYP2C9*3), en comparación con el 1-2% (CYP2C9*2) y el 0 (CYP2C9*3) en los asiáticos, o el 0,5-1% (CYP2C9*2) y el 1% (CYP2C9*3) en los africanos.

El acenocumarol se inactiva como resultado de la hidroxilación por parte del CYP2C9, por este motivo los individuos portadores de al menos un alelo CYP2C9 defectuoso, en especial el CYP2C9*3, son candidatos potenciales de presentar una anticoagulación excesiva para dosis medias de acenocumarol, son los llamados "metabolizadores pobres".

Múltiples estudios han confirmado que los SNPs de los genes VKORC1 y CYP2C9 representan los principales determinantes genéticos del acenocumarol, pudiendo llegar a explicar un 29% (21-36) y un 10% (5-14) respectivamente de la variabilidad en los requerimientos de dosis (46).

CYP4F2

Se ha determinado que una variante en el gen CYP4F2 (c.1297G>A, V433M, rs2108622) está asociado a un aumento de la dosis de acenocumarol. McDonald et al. sugirieron que el polimorfismo CYP4F2 c.1297G>A puede conducir a la pérdida de la actividad de la enzima CYP4F2 en los niveles translacionales o postraduccionales. Portadores de la variante del CYP4F2 c.1297G>A presentan una reducida capacidad para metabolizar la vitamina K, lo cual resulta en un nivel elevado hepático, necesitando una dosis mayor de acenocumarol para alcanzar similar respuesta anticoagulante.

Esta variante se ha considerado un factor genético menos significativo de la dosis de acenocumarol, y podría explicar el 7% de la variabilidad de la dosis de acenocumarol en pacientes españoles (47). Según la etnia la influencia de polimorfismos del CYP4F2 puede ser incluso mayor, un estudio realizado en población eslava concluye que el CYP4F2 podría explicar en torno al 18% de la variabilidad en la dosis requerida (48).

Otros genes

El estudio de los polimorfismos que influyen en la dosis estable de acenocumarol está en continua evolución, siempre con el objetivo de mejorar aún más la capacidad de predicción de los modelos actuales. De esta forma, se sabe que la mayoría de los fármacos utilizados

clínicamente son metabolizados por las enzimas CYP450 hepáticas de tipo II que requieren la actividad de la P450 oxidoreductasa (POR). La POR transfiere electrones de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato a todas las enzimas CYP450 microsomaes tipo II.

Agrawal et al, concluyeron que una diferencia en el tamaño del sustrato también podría implicar discrepancias con respecto al efecto POR*28 (49). En otro estudio, de Jonge et al, (50) informaron de un aumento de la actividad del CYP3A5 ligada al alelo POR*28 en el inmunosupresor tacrolimus. Elens, et al, (51) indicaron, sin embargo, que la variante POR*28 está asociada a una reducción de la actividad del CYP3A5 hacia el midazolam. Además, Ragia et al, no encontraron ninguna asociación entre el alelo POR*28 y el efecto reductor de lípidos de la simvastatina y atorvastatina (52).

En cuanto al CYP2C9, Subramanian et al, (53) evaluaron el efecto de las variantes de POR en tres sustratos (diclofenaco flurbiprofeno y tolbutamida) y concluyeron que variantes del POR*28 aumentaba la actividad del CYP2C9, en comparación con el POR de tipo salvaje. En cambio, las variantes R457H y A287P del POR se asociaron con una actividad reducida en todas las variantes del CYP2C9 y en todos los sustratos. Por lo tanto, no existe un comportamiento único de los distintos polimorfismos del POR. Un estudio de Zhang et al, (54) demostró por primera vez la asociación entre POR rs2868177, POR -173C>A y POR -208C>T con la variación interindividual de las necesidades de dosis de warfarina. POR 173C>A y 208C>T se asociaron negativamente con la dosis de warfarina, mientras que POR rs2868177 se asoció de forma positiva; la contribución estimada de los tres SNPs de POR en este estudio fue de al menos un 4%. Por otro lado, Tan et al,, (55) publicaron un estudio realizado en pacientes chinos de la etnia Han con RV mecánica y concluyeron que los SNPs de POR rs2868177 y POR*28 no afectaban significativamente a la dosis estable de warfarina. Además, en la regresión lineal simple, ninguno de los dos polimorfismos del POR se asoció con la dosis estable de warfarina ($p > 0,1$).

2.7 Algoritmos de dosificación de acenocumarol guiada por el genotipo

A pesar de que los factores genéticos son los que más influyen en la variabilidad de la dosis de acenocumarol, los factores demográficos y clínicos como la edad, el índice de masa corporal (IMC) y la medicación concomitante, son también de gran importancia y pueden explicar entre el 14% - 24% de la variación de la dosis de acenocumarol (56, 57). En este contexto, los algoritmos de dosificación guiada por el genotipo, que se utilizan para estimar la dosis de mantenimiento adecuada de acenocumarol teniendo en cuenta información genética y

clínica, se han investigado ampliamente en varios países y para varias poblaciones específicas, con el fin de predecir una dosis estable y reducir de esta forma el riesgo de aparición de acontecimientos adversos. La mayor parte de los estudios se han desarrollado en población caucásica, posiblemente debido a que los principales usuarios de acenocumarol son pacientes europeos, y 2 algoritmos desarrollados en población india (Tabla 3).

Van Schie, et al, publicaron la primera propuesta de algoritmo de dosificación de acenocumarol desarrollado en una cohorte de 471 pacientes con diversas patologías en tratamiento con acenocumarol, teniendo en cuenta factores demográficos, clínicos y genéticos. Los autores desarrollaron un algoritmo guiado por genotipo y uno no guiado por genotipo para determinar la dosis de mantenimiento de acenocumarol. Las variables definidas para desarrollar el algoritmo no guiado por el genotipo fueron: la edad, el sexo, el uso de amiodarona, la altura y el peso al inicio del tratamiento anticoagulante, mientras para el algoritmo farmacogenético, se añadieron los resultados de la determinación de los polimorfismos del CYP2C9 y VKORC1. Los resultados obtenidos muestran que el algoritmo farmacogenético desarrollado puede explicar un 52.6% de la variabilidad comparado con un 23,7% del algoritmo no guiado por genotipo (57).

Nuestro grupo desarrolló un algoritmo de dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa. Se reclutaron 147 pacientes que se encontraban con una dosis estable de acenocumarol con un INR entre 2 y 3. Los factores clínicos y demográficos incluidos en el algoritmo fueron: edad, IMC, medicación concomitante. Mientras que los factores genéticos fueron: variaciones en *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* y *APOE*. Los resultados obtenidos fue que el uso del algoritmo clínico pudo explicar en torno al 22% de la variabilidad de la dosis, la cual aumentó a 60,6% tras incluir información farmacogenética. El error absoluto medio (MAE por sus siglas en inglés) de la dosis predicha de acenocumarol del algoritmo farmacogenético fue de 3,63 mg/semana, frente a 5,08 mg/semana del algoritmo clínico. Desde el punto de vista de relevancia clínica, el algoritmo farmacogenético predijo correctamente la dosis estable real de acenocumarol en 59,8% de los casos frente a 37,6% del algoritmo clínico. Con estos resultados se demuestra que el algoritmo farmacogenético desarrollado tiene una capacidad de predicción de la dosis estable de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa mejor que el uso únicamente de las variables clínicas (58).

Cerezo-Manchado, et al, publicaron en el año 2013 el desarrollo de un algoritmo farmacogenético de predicción de la dosis estable de acenocumarol. Para desarrollar el algoritmo se usaron retrospectivamente los datos de 973 pacientes anticoagulados. Los factores

clínicos incluidos en el algoritmo fueron: edad, índice de masa corporal y el área de superficie corporal, mientras que las variables genéticas incluidas fueron polimorfismos del *VKORC1*, *CYP2C9* y *CYP4F2*. La variabilidad explicada a través del algoritmo clínico es del 15%, mientras que los factores genéticos explicaban en torno al 30% de la variabilidad, y en combinación, el algoritmo farmacogenético podía explicar el 48% de la variabilidad en los requerimientos de dosis (56).

Otro estudio realizado en población española publicado por Jiménez-Varo, et al, en 134 pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular y tromboembolismo venoso. Las variables clínicas estudiadas fueron: edad, sexo, índice de masa corporal, la patología, uso de fármacos inhibidores del *CYP2C9*, hábito tabáquico e ingesta de alcohol. Entre las variables genéticas se encontraban variantes conocidas del *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* y otras cuya asociación con la dosis de acenocumarol no está bien establecida, tal como *ABCB1*, *APOE*, *CYP2C19* y *GGCX*. Finalmente, las variables que tuvo significancia estadística en el algoritmo clínico fueron: la edad, el índice de masa corporal, el uso de simvastatina (como inhibidor del *CYP2C9*), pudiendo explicar un 14% de la variabilidad. Mientras que el algoritmo farmacogenético, incluyó las siguientes variables: edad, índice de masa corporal, uso de simvastatina, uso de amiodarona, polimorfismos del *CYP2C9*, *VKORC1* y *APOE*, pudiendo explicar un 56,6% de la variabilidad. Siendo el *VKORC1* el predictor más potente (31,5% de la variabilidad) seguido del *CYP2C9* (9,8%) (59).

Otras poblaciones también han publicado algoritmos de dosificación de acenocumarol. Rathore, et al, crearon un algoritmo farmacogenético en pacientes del norte de India, cuyas variables incluidas se encuentran: la edad, el sexo, estatura, peso, área de superficie corporal, hábito tabáquico, polimorfismos de *VKORC1*, *CYP4F2*, *CYP2C9*2*, **3* y *GGCX*. El algoritmo fue capaz de explicar el 41.4% de la variabilidad en la dosis de acenocumarol (60). Por otra parte, Krishna Kumar et al, evaluó la influencia de factores genéticos como el *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* y *GGCX* en la dosis estable de acenocumarol en pacientes del Sur de India, desarrollando un algoritmo farmacogenético en una cohorte de 230 pacientes. Las variantes genéticas de *CYP2C9* y *GGCX* se asociaron con una dosis menor de acenocumarol, mientras que *CYP4F2* se asoció con dosis mayores. La edad, el índice de masa corporal, polimorfismos del *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* y *GGCX* fueron los principales determinantes de la dosis de mantenimiento de acenocumarol, representando el 61,8 % de su variabilidad (61).

Tabla 4. Algoritmos de dosificación de acenocumarol con las variables clínica y genéticas

Algoritmo	R ² CD	Variables clínicas									Variables genéticas				
		Edad	Sexo	Peso	Estatura	IMC	Amiodarona / Inhibidor	Inductores	Fumador	Cirugía	CYP2C9	VKORC1	CYP4F2	APOE	GGCX
EU-PACT (57)	n=375 52,6%	√	√	√	√		√				√	√			
HULP (58)	n=117 60,6%	√				√	√	√			√	√	√	√	
Cerezo-Manchado (56)	n=973 50%	√				√					√	√	√		
Jimenez-Varo (59)	n=134 56,6%	√				√	√				√	√		√	
Rathore (Norte India) (60)	n=125 41,4%	√	√	√	√				√	√	√	√	√		√
Kumar (Sur India) (61)	n=217 61,5%	√				√					√	√	√		√

CD: Cohorte de derivación; HULP: Hospital Universitario La Paz

2.8 Eficacia de los algoritmos farmacogenéticos: ensayos clínicos

Los algoritmos de dosificación de acenocumarol y warfarina guiados por el genotipo han obtenido resultados contradictorios, pero sin dudas prometedores. Como parte de su validación para poder ser incluidos como biomarcadores en la práctica clínica habitual, se necesitan resultados de ensayos clínicos aleatorizados para confirmar su eficacia y seguridad en la práctica clínica.

Por este motivo, en los últimos años se han publicado en la literatura resultados de ensayos clínicos evaluando la utilidad clínica de los AVKs, de estos los de warfarina son los más numerosos. Estos estudios midieron resultados como el porcentaje de tiempo dentro del rango terapéutico (TTR), los acontecimientos adversos (hemorragias importantes y acontecimientos tromboembólicos) y el tiempo para alcanzar una dosis estable. Los principales ensayos clínicos publicados para warfarina se muestran en la tabla 4.

Cabe resaltar las publicaciones en el New England Journal of Medicine de dos ensayos clínicos en el año 2013, para aportar evidencias del potencial predictivo de los algoritmos farmacogenéticos (62, 63). En primer lugar, el ensayo clínico Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics (COAG), fue el estudio que incluyó el mayor número de pacientes. Se aleatorizó a 1.015 pacientes en dos grupos. Uno de estos grupos utilizó un algoritmo de dosificación farmacogenética que incluía factores clínicos y genéticos y el otro grupo una estrategia de dosificación clínica. Los autores realizaron un seguimiento de los pacientes durante 4 semanas y no encontraron ninguna diferencia en el porcentaje medio del TTR, sin embargo, al analizar los datos por grupo racial (afroamericano *versus* no afroamericanos) encontraron que el porcentaje de TTR en el grupo de pacientes afroamericanos se redujo en el grupo farmacogenético en comparación con el grupo del algoritmo clínico, siendo la diferencia estadísticamente significativa (62). Al contrario que Kimmel et al., el estudio European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy (EU-PACT), del Reino Unido, comparó un algoritmo farmacogenético con una estrategia de dosis fija, realizando un seguimiento de los pacientes durante 3 meses. Observaron que el porcentaje de TTR era estadísticamente mayor en el grupo guiado por el genotipo, en comparación con el grupo de control. Además, hubo significativamente menos incidencias de anticoagulación excesiva (INR $\geq 4,0$) y los pacientes del grupo guiado por el genotipo pudieron alcanzar antes una dosis estable (63).

Tras la publicación de estos dos estudios, se publicaron algunos otros ensayos. Jiang et al. desarrollaron un algoritmo farmacogenético de dosificación de la warfarina en pacientes con fibrilación auricular. Su validación se hizo con otra cohorte de pacientes con la misma patología aleatorizados a iniciar el tratamiento con una dosis predicha por el algoritmo farmacogenético o al grupo control cuya dosificación se hizo según práctica clínica habitual. Demostraron que el tiempo medio transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la dosis estable de warfarina fue significativamente menor en el grupo de dosificación a través del algoritmo farmacogenético en comparación con el grupo de control (64). Gage et al. llevaron a cabo un ensayo clínico para evaluar el riesgo de trombosis venosa profunda entre pacientes con una artroplastia de rodilla o cadera, reclutaron 1650 pacientes que fueron aleatorizados a dosificación por un algoritmo farmacogenético o grupo de dosificación según práctica clínica. Los investigadores observaron un menor riesgo de hemorragia grave, de riesgo de tromboembolismo venoso y de riesgo de INR de 4 o superior en el grupo guiado por el genotipo que en el grupo guiado por la clínica (65).

Tabla 5. Principales ensayos clínicos con warfarina

Estudio (año)	N (GG/GC)	Variantes genéticas	Tiempo de seguimiento o (días)	Grupo genético (GG)	Grupo control (GC)	%TTR (GG)	%TTR (GC)	P
Anderson et al. (2007) (66)	101/99	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A	46	Algoritmo diseñado por el mismo grupo	Nomograma 10 mg/día	69.7	68.6	0.74
Caraco, et al. (2007) (67)	95/96	CYP2C9*2, CYP2C9*3	22	6 diferentes algoritmos ajustados por CYP2C9	Algoritmo clínico	80.4	63.4	<0.001
Huang, et al. (2009) (68)	61/60	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A	50	Algoritmo desarrollado por el grupo	2.5 mg/día	28.1	22.1	0.003
Burmester et al. (2011) (69)	113/112	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A, CYP4F2 c.1297G>A	60	Modelo farmacogenético de Marshfield	Modelo farmacológico de Marshfield	29.1	30.8	0.564
Wang, et al. (2012) (70)	53/53	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A,	50	Algoritmo publicado por Huang et al.	2.5 mg/día	NA	NA	NA
Jonas et al. (2013) (71)	53/53	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A,	90	Algoritmo con genotipo de la escuela de medicina de la universidad de Washington	Algoritmo únicamente con variables clínicas de la escuela de medicina de la universidad	40	43	0.59
Kimmel et al (2013) (62)	484/471	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A,	30	Algoritmo farmacogenético de inicio de dosis	Algoritmo clínico de inicio de dosis	45.2	45.4	0.91
Pirmohamed et al. (2013) (63)	211/226	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 c-1639G>A	90	Algoritmo de dosis de inicio	Algoritmo de dosis fija basada en la edad	67.4	60.3	<0.001

Hasta la fecha la gran mayoría de los ensayos clínicos de evaluación de la eficacia de algoritmos farmacogenéticos en anticoagulantes orales AVK se han llevado a cabo con warfarina, y se ha encontrado publicado únicamente 2 con acenocumarol (64, 65).

El ensayo clínico EU-PACT (64), que inicialmente eran dos ensayos clínicos, uno con acenocumarol y el otro con fenprocumón, que, por falta de poder, se decidió combinar ambos estudios para su análisis, comparó el efecto de un algoritmo farmacogenético frente al de un algoritmo de dosificación basado únicamente en variables clínicas. El algoritmo de dosificación guiada por el genotipo incluyó variables clínicas y el genotipo para CYP2C9 y VKORC1 y el algoritmo clínico incluyó únicamente variables clínicas para el inicio del tratamiento con acenocumarol o fenprocumón en pacientes con fibrilación auricular o tromboembolismo venoso. Los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de tiempo dentro del rango terapéutico de INR entre los dos grupos ($p = 0.52$).

Mientras que Cerezo-Manchado, et al, reclutaron en total 179 pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular que iban a iniciar tratamiento con acenocumarol, fueron aleatorizados a grupo de dosificación según algoritmo farmacogenético (un algoritmo desarrollado por el mismo grupo) y grupo de dosis según práctica clínica. Los resultados obtenidos muestran que, tras 90 días de haber iniciado el tratamiento, un porcentaje superior de pacientes del grupo de dosificación según el algoritmo farmacogenético alcanzó una dosis estable comparado con el grupo de dosificación según práctica clínica habitual (39% vs 25%, $p=0.038$). Así mismo el grupo de dosificación según algoritmo farmacogenético necesitó menor número de días para alcanzar el INR terapéutico ($p=0.033$) (65).

Parece indudable el peso que tienen las variantes genéticas (CYP2C9 y VKORC1 principalmente) sobre la variabilidad en la dosis requerida de acenocumarol, el cual aumenta aún más al combinarse con factores clínicos y demográficos, sin embargo, los únicos dos ensayos clínicos publicados no muestran resultados concluyentes acerca de su utilidad al incluirse dentro de la rutina clínica. Si bien es cierto que hay diferencias por un lado en el desarrollo de los algoritmos de dosificación, las variables a incluir, la etnia en el que se desarrolla, la(s) enfermedad(es) de base, el modelo aplicado, etc. Y por otro lado, diferencias en el diseño de los ensayos clínicos, como por ejemplo, el grupo control de los distintos estudios son o tratados según práctica clínica habitual o según algoritmo desarrollado únicamente utilizando las variables clínicas, también podemos encontrar diferencias en el endpoint primario, los más utilizados son el porcentaje de tiempo en rango terapéutico y el tiempo hasta

alcanzar dosis estable. También está el hecho de reclutar pacientes con una única patología o una población mixta.

En definitiva, la aplicación clínica de los factores genéticos como biomarcadores para ayudar a predecir la dosis estable de acenocumarol está lejos de poder implementarse de forma generalizada en los sistemas de salud.

2.9 Antecedentes

Este proyecto de investigación se inició en el año 2007 con el desarrollo del primer algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol de nuestro grupo, en donde se identificaron las variables demográficas, clínicas y genéticas que influyen en la dosis estable de acenocumarol en una cohorte de pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (58). Contó con ayuda de financiación pública en la convocatoria de ese año de los Proyectos de Investigación en Salud. Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070710). Una vez identificadas las variables genéticas de interés, era necesario el desarrollo de una técnica de genotipado que permitiera su implementación en la rutina asistencial, que sea fácil de realizar, rápida y con un coste asumible en el Sistema Nacional de Salud. De esta forma, se desarrolló un método basado en un ensayo simple y robusto de minisequenciación, que permite el genotipado simultáneo de 6 alelos implicados en la dosis estable de acenocumarol (72). El siguiente paso y previo a la implementación del algoritmo farmacogenético de dosificación en la rutina asistencial, era la demostración con evidencias clínicas de alto nivel de su eficiencia y efectividad para lo cual se diseñó un ensayo clínico aleatorizado. Se empezó a escribir el protocolo a finales del año 2009, el cual fue publicado (73). Recibió financiación pública en la convocatoria de ese año de las “Ayudas para el fomento de la traslación de la aplicación terapéutica de medicamentos huérfanos y terapias avanzadas” (TRA-010) del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Durante el año 2010 y primer trimestre del año 2011 se planificó y puso en marcha la fase de inicio del ensayo clínico, con la solicitud de autorización por parte de la AEMPS y del CEIC, así mismo se planificó la estrategia para el envío y centralización de muestras para determinación genética, el desarrollo de un CRD electrónico, el plan de monitorización, el sistema de farmacovigilancia, etc. Estos 3 artículos iniciales dieron lugar a una tesis doctoral por compendio de publicaciones.

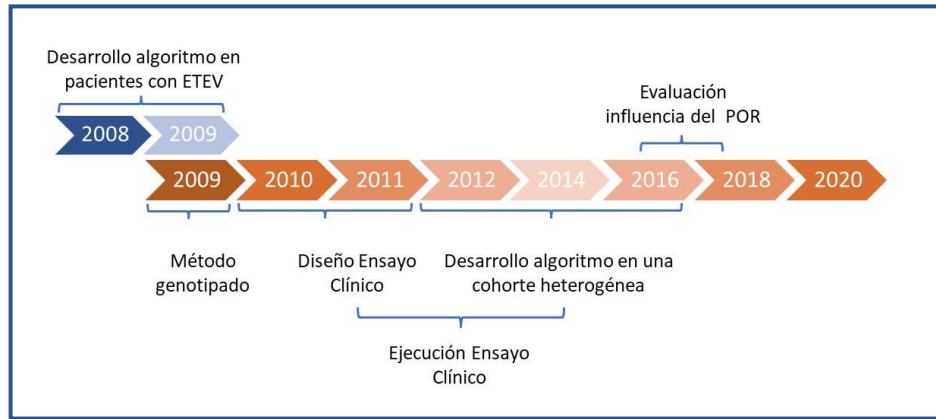


Figura 2. Cronograma completo del proyecto

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1 General:

El uso de algoritmos farmacogenéticos contribuye a mejorar la efectividad y seguridad de los pacientes anticoagulados con acenocumarol.

3.2 Específicas:

1. El uso de algoritmos farmacogenéticos para la individualización de la dosis de acenocumarol puede ser aplicado a cualquier tipo de patología.
2. El uso de un algoritmo farmacogenético para la individualización de la dosis de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa puede ser aplicable en la práctica clínica.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales:

1. Desarrollo de un modelo predictivo de la dosis estable de acenocumarol en diversas patologías.
2. Validación prospectiva de un algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la influencia de factores genéticos y factores no genéticos sobre la variabilidad en la dosis de acenocumarol en diversas patologías.
2. Evaluar la efectividad de un algoritmo de dosificación de acenocumarol que incorpora variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas de pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.
3. Evaluar la seguridad de la incorporación de datos genéticos en el ajuste de la dosis, comparando la frecuencia de aparición de acontecimientos clínicos relevantes en pacientes cuya dosis se ajusta mediante el algoritmo farmacogenético frente a la práctica clínica habitual.

PACIENTES Y MÉTODOS

5. PACIENTES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos utilizados en este proyecto se detallarán en los apartados correspondientes de cada uno de los estudios que se incluyen en esta tesis presentada como compendio de publicaciones. En esta memoria de proyecto de tesis doctoral se incluyen 3 estudios realizados por nuestro grupo de investigación y un metaanálisis colaborativo internacional. Los estudios han sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Uno de los estudios fue aprobado también por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. El ensayo clínico ha sido aprobado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

La planificación se inició durante el año 2009, recibió ayuda a través de financiación pública obtenida en la siguiente convocatoria:

- Ayudas para el fomento de la traslación de la aplicación terapéutica de medicamentos huérfanos y terapias avanzadas (TRA-010). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Convocatoria del año 2009.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (EC11-210). Instituto de Salud Carlos III. Convocatoria año 2012
- Consejería de Salud de Andalucía. Fundación Progreso y Salud, (PI-0717-2013)

Este proyecto de investigación ha dado lugar a 7 publicaciones a lo largo de todos estos años, de las cuales 4 forman parte de esta tesis, dando respuesta a los 3 objetivos específicos planteados.

5.1 Artículos publicados

1. TÍTULO: A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population.

AUTORES: Hoi Y. Tong, Cristina Lucía Dávila-Fajardo, Alberto M. Borobia, Luis Javier Martínez-González, Rubin Lubomirov, Laura María Perea León, María J. Blanco Bañares, Xando Díaz-Villamarín, Carmen Fernández-Capitán, José Cabeza Barrera, Antonio J. Carcas, PGX-ACE Investigators Group

REVISTA: PLoS One. Factor de Impacto 2.74 (2019): Q1

CITA: Tong HY, Dávila-Fajardo CL, Borobia AM, Martínez-González LJ, Lubomirov R, Perea León LM, Blanco Bañares MJ, Díaz-Villamarín X, Fernández-Capitán C, Cabeza Barrera J, Carcas AJ; PGX-ACE Investigators Group. A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. PLoS One. 2016 Mar 15;11(3):e0150456. doi: 10.1371/journal.pone.0150456. PMID: 26977927; PMCID: PMC4792430.

2. TÍTULO: Influence of two variants of CYP450 oxidoreductase on the stable dose of acenocoumarol in a Spanish population.

AUTORES: Hoi Y Tong, Alberto M Borobia, José Carlos Martínez Ávila, Rubin Lubomirov, Mario Muñoz, María J Blanco Bañares, Rafael Hernández, Carmen Fernández Capitán, Elena Ramírez, Jesús Frías, Antonio J Carcas.

REVISTA: Pharmacogenomics. Factor de Impacto: 2.533 (2020); Q1

CITA: Tong HY, Borobia AM, Martínez Ávila JC, Lubomirov R, Muñoz M, Blanco Bañares MJ, Hernández R, Fernández Capitán C, Ramírez E, Frías J, Carcas AJ. Influence of two variants of CYP450 oxidoreductase on the stable dose of acenocoumarol in a Spanish population. Pharmacogenomics. 2017 Jun;18(8):797-805. doi: 10.2217/pgs-2017-0021. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28592191.

3. TÍTULO: Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithm versus Usual Care in Patients with Venous Thromboembolism: A Randomised Clinical Trial

AUTORES: Hoi Yan Tong, Alberto M. Borobia, Manuel Quintana-Díaz, Sara Fabra, Manuel González-Viñolis, Carmen Fernández-Capitán, María A. Rodríguez-Dávila, Alicia Lorenzo, Ana María López-Parra, Nuria Ruiz-Giménez, Francisco Abad-Santos, Carmen Suarez, Olga Madridano, Jorge Francisco Gómez-Cerezo, Pilar Llamas, Carlos Baeza-Richer, Eduardo Arroyo-Pardo, Antonio J. Carcas and The PGX-ACE Spanish Investigators Group.

REVISTA: Journal of Clinical Medicine, Factor de Impacto 4.241 (Q1)

CITA: Tong HY, Borobia AM, Quintana-Díaz M, Fabra S, González-Viñolis M, Fernández-Capitán C, Rodríguez-Dávila MA, Lorenzo A, López-Parra AM, Ruiz-Giménez N, Abad-Santos F, Suarez C, Madridano O, Gómez-Cerezo JF, Llamas P, Baeza-Richer C, Arroyo-Pardo E, Carcas AJ, The Pgx-Ace Spanish Investigators Group. Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithm versus Usual Care in Patients with Venous Thromboembolism: A Randomised Clinical Trial. J Clin Med. 2021 Jun 30;10(13):2949. doi: 10.3390/jcm10132949. PMID: 34209131; PMCID: PMC8268204.

4. TÍTULO: Effect of CYP4F2, VKORC1, and CYP2C9 in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals.

AUTORES: Elisa Danese, Sara Raimondi, Martina Montagnana, Angela Tagetti, Taimour Langae, Paola Borgiani, Cinzia Ciccacci, Antonio J. Carcas, Alberto M. Borobia, Hoi Y. Tong, Cristina Dávila-Fajardo, Mariana Rodrigues Botton, Stephane Bourgeois, Panos Deloukas, Michael D. Caldwell, Jim K. Burmester, Richard L. Berg, Larisa H. Cavallari, Katarzyna Drozda, Min Huang, Li-Zi Zhao, Han-Jing Cen, Rocio Gonzalez-Conejero, Vanessa Roldan, Yusuke Nakamura, Taisei Mushiroda, Inna Y. Gong, Richard B. Kim, Keita Hirai, Kunihiro Itoh, Carlos Isaza, Leonardo Beltrán, Enrique Jiménez-Varo, Marisa Cañadas-Garre, Alice Giontella, Marianne K. Kringen, Kari Bente Foss Haug, Hye Sun Gwak, Kyung Eun Lee, Pietro Minuz, Ming Ta Michael Lee, Steven A. Lubitz, Stuart Scott, Cristina Mazzaccara, Lucia Sacchetti, Ece Genç, Mahmut Özer, Anil Pathare, Rajagopal Krishnamoorthy, Andras Paldi, Virginie Siguret, Marie-Anne Lorient, Vijay Kumar

Kutala, Guilherme Suarez-Kurtz, Jamila Perini, Josh C. Denny, Andrea H. Ramirez, Balraj Mittal, Saurabh Singh Rathore, Hersh Sagreiya, Russ Altman, Mohamed Hossam A. Shahin, Sherief I. Khalifa, Nita A. Limdi, Charles Rivers, Aditi Shendre, Chrisly Dillon, Ivet M. Suriapranata, Hong-Hao Zhou, Sheng-Lan Tan, Vacis Tatarunas, Vaiva Lesauskaite, Yumao Zhang, Anke H. Maitland-van der Zee, Talitha I. Verhoef, Anthonius de Boer, Monica Taljaard, Carlo Federico Zambon, Vittorio Pengo, Jieying Eunice Zhang, Munir Pirmohamed, Julie A. Johnson, and Cristiano Fava

REVISTA: *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, Factor de Impacto. 6.565 (2020); Q1

CITA: Danese E, Raimondi S, Montagnana M, Tagetti A, Langaee T, Borgiani P, Ciccacci C, Carcas AJ, Borobia AM, Tong HY, Dávila-Fajardo C, Rodrigues Botton M, Bourgeois S, Deloukas P, Caldwell MD, Burmester JK, Berg RL, Cavallari LH, Drozda K, Huang M, Zhao LZ, Cen HJ, Gonzalez-Conejero R, Roldan V, Nakamura Y, Mushiroda T, Gong IY, Kim RB, Hirai K, Itoh K, Isaza C, Beltrán L, Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Giontella A, Kringen MK, Haug KBF, Gwak HS, Lee KE, Minuz P, Lee MTM, Lubitz SA, Scott S, Mazzaccara C, Sacchetti L, Genç E, Özer M, Pathare A, Krishnamoorthy R, Paldi A, Siguret V, Loriot MA, Kutala VK, Suarez-Kurtz G, Perini J, Denny JC, Ramirez AH, Mittal B, Rathore SS, Sagreiya H, Altman R, Shahin MHA, Khalifa SI, Limdi NA, Rivers C, Shendre A, Dillon C, Suriapranata IM, Zhou HH, Tan SL, Tatarunas V, Lesauskaite V, Zhang Y, Maitland-van der Zee AH, Verhoef TI, de Boer A, Taljaard M, Zambon CF, Pengo V, Zhang JE, Pirmohamed M, Johnson JA, Fava C. Effect of CYP4F2, VKORC1, and CYP2C9 in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Jun;105(6):1477-1491. doi: 10.1002/cpt.1323. Epub 2019 Feb 17. PMID: 30506689; PMCID: PMC6542461.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Diseñar y validar un nuevo algoritmo farmacogenético en una cohorte de pacientes con diversas patologías que requiera anticoagulación con acenocumarol.

“A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population”

Hoi Y. Tong, Cristina Lucía Dávila-Fajardo, Alberto M. Borobia, Luis Javier Martínez-González, Rubín Lubomirov, Laura María Perea León, María J. Blanco Bañares, Xando Díaz-Villamarín, Carmen Fernández-Capitán, José Cabeza Barrera, Antonio J. Carcas, PGX-ACE Investigators Group.

PLoS One 11(3):e0150456. doi: 10.1371/journal.pone.0150456

Este trabajo responde al objetivo general 1 y objetivo específico 1.

NUEVO ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE PREDICCIÓN DE DOSIS DE ACENOCUMAROL PARA OBTENER UNA ANTICOAGULACIÓN ESTABLE EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON DIVERSAS PATOLOGÍAS QUE REQUIERA ANTICOAGULACIÓN CON ACENOCUMAROL

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional, transversal. Los pacientes fueron reclutados desde diferentes servicios del Hospital Universitario La Paz (HULP) en Madrid y Hospital Universitario San Cecilio (HUSC) en Granada y de un centro de salud perteneciente al área de salud del Hospital Universitario La Paz. Este estudio fue aprobado por los Comité de Ética de la Investigación con medicamentos de ambos hospitales participantes.

Pacientes y recogida de datos

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa, reemplazo valvular u otra patología.
- Los pacientes se encontraban en tratamiento con acenocumarol a una dosis estable, definida como una variación de la dosis semanal de <20% en los últimos 3 meses de forma consecutiva.
- Con un INR objetivo de entre 2 y 3 para fibrilación auricular y enfermedad tromboembólica venosa y entre 2.5 y 3.5 en pacientes con diagnóstico de reemplazo valvular u otras patologías

El INR se midió según la técnica utilizada en cada centro de reclutamiento. En el HULP, el análisis se realizó mediante un coagulómetro semiautomatizado Thrombotrack® (Baxter) con reactivos Thrombotest. En el HUSC, se utilizó el microINR de iLine microsystems, y el Centro de Salud utilizó un coagulómetro portátil INRatio (Grifols).

Los datos recogidos incluían la edad, el sexo, la raza, el peso y la estatura, los resultados del INR, la dosis de acenocumarol administrada en los últimos 3 meses consecutivos, medicamentos concomitantes y el rango de INR objetivo.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (HULP) y muestras de células de la mucosa bucal (HUSC) y se almacenaron a -20°C.

Genotipado

Para la extracción de ADN se utilizó el kit QuickGene DNA blood S (Fujifilm, Düsseldorf, Alemania) en el HULP; el procedimiento de extracción de ADN en el HUSC se realizó según el método publicado anteriormente por Freeman et al. (74), con una serie de modificaciones descritas por Gómez-Martín A. et al. (75). Se utilizaron para el genotipado las tecnologías KASPar® (KBiosciences, Hoddesdon, Reino Unido) y TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). Se calcularon las frecuencias de los genotipos y se comprobó el equilibrio de las distribuciones de Hardy-Weinberg.

Generación del algoritmo

Se eligió al azar al 80% de los pacientes ($n = 556$), considerando una distribución equitativa de genotipos (CYP2C9, VKORC1 y CYP4F2) para formar la cohorte de generación del algoritmo. El 20% restante ($n = 129$) conformó la cohorte de validación del nuevo algoritmo.

Se realizó análisis univariante para cada variable ($p \leq 0.05$ estadísticamente significativo); sin embargo, las que alcanzaron valores p inferiores a 0,1 se incluyeron en un análisis multivariante. Finalmente se eligió la regresión lineal múltiple para generar el algoritmo, dado que el método sería más fácilmente transformable en una ecuación útil en la práctica clínica habitual. Después de este proceso, se seleccionaron aquellas variables con valores p consistentemente inferiores a 0,05 para ser incluidas en el algoritmo farmacogenético. En el caso de las variables casi significativas con plausibilidad biológica y evidencia previa de asociación con la dosis de acenocumarol, también fueron incluidas en el algoritmo. La variable dependiente fue la dosis de acenocumarol requerida (con transformación logarítmica neperiana) para obtener un rango objetivo estable de INR. Como variables independientes, se incluyeron las variables demográficas, clínicas y genéticas seleccionadas. Para dilucidar la contribución de las características demográficas y clínicas de los pacientes tal y como se utilizan actualmente en la práctica clínica, se diseñó un algoritmo clínico con las variables incluidas en el algoritmo farmacogenético a excepción de los polimorfismos genéticos.

El rendimiento de los algoritmos farmacogenético y clínico se evaluó calculando el coeficiente de determinación (R^2) que representa la variabilidad explicada por cada modelo.

La exactitud y precisión del modelo se evaluó mediante el error medio (ME; media entre las dosis de acenocumarol predichas y las observadas) y el error medio absoluto (MAE; diferencia absoluta media entre las dosis de acenocumarol predichas y observadas). El ME y el

MAE también se calcularon como los porcentajes de la dosis de acenocumarol observada (%ME y %MAE). El ME refleja la exactitud de la predicción, y el MAE es una estimación de la precisión del modelo.

Relevancia clínica

Para evaluar la relevancia clínica del modelo, clasificamos a los pacientes en 3 grupos de acuerdo con la dosis real administrada: un grupo de dosis bajas (<11 mg/semana), un grupo de dosis intermedia (11-21 mg/semana) y un grupo de dosis altas (>21 mg/semana). Se calculó la proporción de pacientes en los que la dosis prevista estaba dentro del 20% de la dosis real (considerada como dosis correcta). Se determinó la dosis predicha aplicando los algoritmos farmacogenético y clínico.

Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS 16.0 (IBM Inc., IL, USA).

Resultados

Características de los pacientes

- Datos demográficos

La cohorte de generación del algoritmo estaba conformada por 556 pacientes; 283 de ellos eran mujeres (50,9%); la media (DE) era de 68,7 (12,41) años. Mientras que la cohorte de validación la conformaban 129 pacientes, con una media de edad de 67,6 (14,8) años, 54 de los cuales eran mujeres (41,9%). En ambos grupos había datos perdidos: el uso de amiodarona en 2 pacientes de la cohorte de generación y el peso y la altura en 1 paciente de la cohorte de validación.

Excluyendo a los pacientes con datos faltantes, 554 pacientes conformaron la cohorte de generación y 128 pacientes la cohorte de validación. Las características clínicas y demográficas y la frecuencia del genotipo de ambos grupos se muestran en la tabla 5.

Tabla 6. Características de los pacientes en las cohortes de generación (n=556) y validación (n=129)

Variables	Cohorte de Derivación (n = 556)	Cohorte de Validación (n = 129)	p
Sexo [n (%)]			
Mujer/Hombre	283/273 (50,9/49,1)	54/75 (41,9/58,1)	0,078
Edad, en años [media (DE)]	68,7 (12,41)	67,6 (14,80)	0,446
Peso, en kilogramos [media (DE)]	75,8 (14,16)	78,06 (16,26) [□]	0,147
Estatura, en metros [media (DE)]	1,62 (0,09)	1,64 (0,10) [□]	0,107
Índice de Masa Corporal (IMC), en kg/m ² [media (DE)]	28,73 (4,86)	28,93 (4,30) [□]	0,653
Enfermedad de base [n (%)]			
Enfermedad tromboembólica venosa (EDEV)	160 (28,8)	42 (32,6)	
Fibrilación auricular (FA)	263 (47,3)	59 (45,7)	
Reemplazo valvular (RV)	115 (20,8)	26 (20,2)	
Otras enfermedades (OE)	18 (3,2)	2 (1,6)	
Dosis semanal de acenocumarol [media (DE)]	15,16 (0,30)	15,5 (0,67)	0,632
Tratamiento concomitante			
Inductores enzimáticos * [Sí/No] [n (%)]	107/448 (19,3/80,7) [∇]	29/100 (22,5/77,5)	0,412
Amiodarona [Sí/No] [n (%)]	27/527 (4,9/94,6) [¥]	9/120 (7/93)	0,380
Fenotipo [n (%)]			
≤11 mg/semana	177 (31,8)	39 (30,2)	
11–21 mg/semana	279 (50,2)	62 (48,1)	
≥21 mg/semana	100 (18)	28 (21,7)	
CYP2C9 [n (%)]			0,881
*1/*1	325 (58,5)	77 (59,7)	
*1/*2	138 (24,8)	30 (23,3)	
*1/*3	62 (11,2)	16 (12,4)	
*2/*2	12 (2,2)	2 (1,6)	
*2/*3	14 (2,5)	4 (3,1)	
*3/*3	5 (0,9)	0 (0)	
VKORCI [n (%)]			0,874
Homocigoto wt/wt	202 (36,4)	47 (36,4)	
Heterocigoto	277 (49,8)	62 (48,1)	
Homocigoto mut/mut	77 (13,8)	20 (15,5)	
CYP4F2 [n (%)]			
MM	83 (14,6)	14 (12,3)	0,455
APOE rs7412 [n (%)]			0,621
Homocigoto wt/wt	494 (88,9)	116 (89,9)	
Heterocigoto	58 (10,4)	13 (10,1)	
Homocigoto mut/mut	4 (0,7)	0 (0)	

Abreviaturas: DE: desviación estándar; mut: mutado; wt: wild type.

Inductores enzimáticos considerados en este análisis incluyen: fenitoína, carbamazepina y rifampicina.

[∇] Datos perdido, n=555

[¥] Datos perdido, n=554

♦ Datos perdido, n=128

La indicación de anticoagulación más frecuente en la cohorte fue la FA (47%), seguida de la EDEV (29,5%). Al comparar las características de los pacientes entre las distintas

enfermedades (Tabla 6), encontramos que los pacientes con FA eran mayores ($72,44 \pm 8,90$ años) y tenían un mayor IMC ($29,55 \pm 4,77$) ($p < 0,001$), y la dosis de acenocumarol era significativamente menor que la de los otros grupos ($p < 0,001$). En cuanto a la medicación concomitante, en este grupo había más pacientes tratados con amiodarona (9%) en comparación con los grupos con otras enfermedades ($p < 0,001$). No hubo diferencias en la distribución del genotipo entre las distintas enfermedades.

Tabla 7. Características de los pacientes según enfermedad.

Variables	ETEV (n=202)	FA (n=322)	RV (n=141)	OE (n=20)	p
Sexo [n (%)]					
Hombre	100 (49,5)	176 (54,7)	63 (44,7)	9 (45)	0,218
Mujer	102 (50,5)	146 (45,3)	78 (55,3)	11 (55)	
Edad, en años [media (DE)]	66,12 (16,91)	72,44 (8,90)*	64,37 (10,32)	57,65 (15,83)	<0,001
Peso, en kilogramos [media (DE)]	76,51 (16,20)	78,43 (13,44) ‡	70,93 (13,84)	76,15 (10,84)	<0,001
Estatura, en metros [media (DE)]	1,63 (0,091)	1,63 (0,091) ‡	1,61 (0,10)	1,63 (0,083)	0,302
Índice de Masa Corporal (IMC), en kg/m ² [media (DE)]	28,67 (5,08)	29,55 (4,77) ‡	27,15 (3,77)	28,81 (4,46)	<0,001
Dosis semanal de acenocumarol [mediana (rango)]	15 (2,5 - 47)	13,49 (3,0 - 37)*	16,48 (2,0 - 38,5)	21 (10,0 - 61,5)	<0,001
Tratamiento concomitante [n (%)]					
Inductores enzimáticos †	25 (12,5)¶	80 (24,8)	26 (18,4)	5 (25)	0,006
Amiodarona	2 (1)¶	29 (9)*‡	5 (3,5)	0	<0,001
Fenotipo [n (%)]					<0,001
<11 mg/semana	66 (32,7)	117 (36,3)	31 (22)	2 (10)	
11-21 mg/semana	86 (42,6)	169 (52,5)	75 (53,2)	11 (55)	
>21 mg/semana	50 (24,8)	36 (11,2)	33 (24,8)	7 (35)	
CYP2C9 [n (%)]					0,084
Homocigoto wt/wt	109 (54)	187 (58,1)	93 (66)	13 (65)	
Heterocigoto	84 (41,58)	112 (34,8)	45 (31,9)	5 (25)	
Homocigoto mut/mut	33 (16,3)	43 (13,4)	19 (13,5)	2 (10)	
VKORC1 [n (%)]					0,800
Homocigoto wt/wt	78 (38,61)	111 (34,5)	52 (36,9)	8 (40)	
Heterocigoto	91 (45)	168 (52,2)	70 (49,6)	10 (50)	
Homocigoto mut/mut	33 (16,3)	43 (13,4)	19 (13,5)	2 (10)	
CYP4F2 [n (%)]					
MM	26 (12,9)	53 (16,5)	16 (11,3)	2 (10)	0,411
APOE rs7412 [n (%)]					0,311
Homocigoto wt/wt	176 (87,13)	292 (90,7)	127 (90,1)	15 (75)	
Heterocigoto	24 (11,9)	29 (9)	13 (9,2)	5 (25)	
Homocigoto mut/mut	2 (1)	1 (0,3)	1 (0,7)	0	

Abreviaturas: ETEV: Enfermedad Tromboembólica Venosa; FA: Fibrilación Auricular; RV: Reemplazo Valvular; OE: Otras Enfermedades; DE: desviación estándar; mut: mutado; wt: wild type.

† Inductores enzimáticos considerados en este análisis incluyen: fenitoína, carbamazepina y rifampicina.

* Grupo con diferencia significativa comparada con otros grupos

¶ Datos perdidos, n=201

‡ Datos perdido, n=321

Algoritmo farmacogenético

Las variables clínicas que se incluyeron finalmente en el algoritmo fueron la edad (años), el peso (kg), el uso de amiodarona, uso de inductor enzimático y rango objetivo del INR (2-3 o 2,5-3,5). Las variables genéticas con significación estadística mantenidas en el algoritmo fueron CYP2C9*1/*2, CYP2C9*1/*3, CYP2C9*2/*2, CYP2C9*2/*3, CYP2C9*3/*3, VKORC1 heterocigoto, VKORC1 homocigoto mutado y CYP4F2 homocigoto mutado.

El resultado fue el logaritmo natural de las dosis medias semanales de acenocumarol (Tabla 7).

Tabla 8. Algoritmos farmacogenético y clínico en la cohorte de generación

Algoritmo Farmacogenético				
Beta	Variable	Valor p	R² ajustada (%)	R² acumulada (%)
3,181	Intercept			
-0,010	Edad	<0,001		
0,005	Peso	<0,001		
0,070	Inductores enzimáticos	0,053		
-0,337	Amiodarona	<0,001		
0,086	INR objetivo	0,014		
	Variables Clínicas		13,1	13,1
-0,111	CYP2C9 *1/*2	<0,001		
-0,323	CYP2C9 *1/*3	<0,001		
-0,691	CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	<0,001		
	CYP2C9		14,3	27,4
-0,302	VKORC1 A/G	<0,001		
-0,727	VKORC1 A/A	<0,001		
	VKORC1		22,9	50,3
0,214	CYP4F2 MM	<0,001		
	CYP4F2		2,5	52,8
Algoritmo Clínico				
2,951	Intercept			
-0,011	Edad	<0,001		
0,004	Peso	0,013		
0,045	Inductor enzimático	0,357		
-0,290	Amiodarona	<0,001		
0,114	INR objetivo	0,016		
	Variables clínicas		13,1	13,1

Beta: coeficiente de regresión estandarizado

Algoritmo farmacogenético: logaritmo natural de las dosis medias semanales de acenocumarol = 3,181 – 0,010*edad (años) + 0,005*peso (kg) + 0,070 (si el paciente tiene tratamiento con inductor enzimático) – 0,337 (si el paciente está en tratamiento con amiodarona) – 0,111 (si presenta CYP2C9*1/*2) – 0,323 (si presenta CYP2C9*1/*3) – 0,691 (si presenta CYP2C9 homocigoto mutado) – 0,302 (si presenta VKORC1 A/G) – 0,727 (si presenta VKORC1 A/A) + 0,214 (si presenta CYP4F2 MM) + 0,086 (si el objetivo de INR es entre 2,5-3,5). El resultado es el logaritmo natural de la dosis media de acenocumarol en mg/semana.

Agrupamos los polimorfismos de las variantes homocigotas del CYP2C9 porque su función parece ser similar. El genotipo APOE no se incluyó en el modelo final debido a que no alcanzó significación estadística ($p = 0,521$; $R^2 = 0,1\%$).

Variabilidad explicada por el algoritmo farmacogenético

La variabilidad explicada por el algoritmo farmacogenético fue del 52,8% en la cohorte de generación y aumentó al 64%, en la cohorte de validación, mientras que el algoritmo clínico explicó el 13,1% y 21,1% de la variabilidad respectivamente. La precisión del algoritmo farmacogenético en ambas cohortes fue buena, con una ME calculada baja (-0,11 mg para la cohorte de generación y 0,04 mg para la cohorte de validación), mientras que la precisión del algoritmo clínico fue mayor: -1,55 (6,57) y -1,62 (6,41), respectivamente. La precisión calculada como MAE fue buena en el algoritmo farmacogenético: 3,77 mg (3,48) en la cohorte de generación y 3,54 mg (2,99) en la cohorte de validación. Para el algoritmo clínico, el MAE fue mayor 4,99 (4,55) y 5,04 (4,25) respectivamente. También se calculó la dosis predicha por ambos algoritmos en toda la cohorte. Para esta cohorte, la R^2 fue del 15,1% para el algoritmo clínico y del 55% para el algoritmo farmacogenético. El ME y el MAE fueron menores en el algoritmo farmacogenético (Tabla 8).

Tabla 9. Rendimiento predictivo de los algoritmos farmacogenéticos y clínicos en las cohortes de generación, validación y completa.

	Algoritmo Farmacogenético			Algoritmo Clínico		
	Cohorte de Generación	Cohorte de Validación	Cohorte Completa	Cohorte de Generación	Cohorte de Validación	Cohorte Completa
R2	52,8%	64%	55%	13,1%	21,1%	15,1%
ME; [media (DE)]	-0,11 (3,48)	0,04 (4,65)	-0,09 (5,04)	-1,55 (6,57)	-1,62 (6,41)	-1,56 (6,54)
MAE; [media (DE)]	3,77 (3,48)	3,54 (2,99)	3,73 (3,39)	4,99 (4,55)	5,04 (4,25)	4,99 (4,49)
%ME; [media (DE)]	10,15 (38,17)	9,95 (35,85)	10,12 (37,72)	9,62 (62,76)	8,95 (54,9)	9,49 (61,32)
%MAE; [media (DE)]	28,52 (27,3)	26,64 (25,89)	28,17 (27,03)	38,97 (50,1)	38,21 (40,29)	38,83 (48,38)

Abreviaturas: ME: error medio (predicho-observado); %ME: error medio expresado en porcentaje ($\%ME = ME/Observado \cdot 100$); MAE: error medio absoluto ($=\sqrt{SQR[(predicho-observado)^2]}$); %MAE: error medio absoluto expresado en porcentaje ($\%MAE = MAE/Observado \cdot 100$).

El rendimiento predictivo del algoritmo farmacogenético se evaluó por enfermedad. Como se muestra en la tabla 9, el grupo de pacientes con la mejor predicción fue el grupo de

pacientes con diagnóstico de fibrilación auricular, con una R^2 de 57,4%, seguido del grupo de pacientes con reemplazo valvular, con una R^2 del 56,3%.

Tabla 10. Rendimiento predictivo del algoritmo farmacogenético por enfermedad en la cohorte completa.

	ETEV (n=202)	FA (n=322)	RV (n=141)	OE (n=20)
R²	51,5%	57,4 %	56,3 %	45,2 %
ME; [media (SD)]	-1,12 (5,53)	0,59 (4,07)	0,22 (5,16)	- 2,59 (9,43)
MAE; [media (SD)]	4,12 (3,85)	3,28 (2,47)	3,91 (3,36)	5,81 (7,78)
%ME; [media (SD)]	2,11 (37,19)	15,23 (38,07)	11,47 (36,52)	-1,19 (31,80)
%MAE; [media (SD)]	26,55 (26,06)	29,68 (28,26)	27,32 (26,73)	26,13 (17,15)

Abreviaturas: ETEV: Enfermedad Tromboembólica Venosa; FA: Fibrilación Auricular; RV: Reemplazo Valvular; OE: Otras Enfermedades; ME: error medio (predicho-observado); %ME: error medio expresado en porcentaje (%ME = ME/Observado*100); MAE: error medio absoluto (= $\text{SQR}[(\text{predicho-observado})^2]$); %MAE: error medio absoluto expresado en porcentaje (%MAE = MAE/Observado*100).

Relevancia clínica

Para comprobar la relevancia clínica del algoritmo, calculamos el porcentaje de pacientes correctamente clasificado dentro del 20% de la dosis real. El porcentaje de pacientes correctamente clasificado por el algoritmo farmacogenético fue del 46%, mientras que el 34% fue clasificado correctamente con el algoritmo clínico (Tabla 10).

Tabla 11. Pacientes correctamente clasificados (dosis predicha dentro del $\pm 20\%$ de la dosis real) en los algoritmos farmacogenético y clínico en las cohortes de generación, validación y completa.

	% Correctamente clasificado		Valor p
	Algoritmo Farmacogenético	Algoritmo Clínico	
Cohorte de Generación (n=556)	46,9 %	34,7 %	<0,001
Cohorte de Validación (n=129)	46,5 %	34,1 %	<0,001
Cohorte Completa (n=685)	46,9 %	34,5 %	<0,001

Si clasificamos a los pacientes en los 3 grupos de dosis (<11 mg/semana, 11-21 mg/semana, >21 semana), podemos ver que el porcentaje de pacientes correctamente clasificado es mayor en el grupo intermedio (11-21 mg/semana) para ambos algoritmos,

mientras que la diferencia entre los 2 algoritmos aumenta en los grupos de dosis extremas. Así, el algoritmo farmacogenético clasificó correctamente el 32,4% del grupo de dosis bajas, en comparación con el 19,9% del algoritmo clínico. Del mismo modo, el algoritmo farmacogenético clasificó correctamente el 41,4% del grupo de dosis altas, en comparación con el 6,3% del algoritmo clínico.

Las diferencias en el MAE también fueron significativas en los grupos de dosis extremas entre los 2 algoritmos (Tabla 11).

Tabla 12. Pacientes correctamente clasificados por grupos de dosis (dosis predicha dentro del $\pm 20\%$ de la dosis real) y MAE de la cohorte completa, según los algoritmos farmacogenético y clínico.

Grupos de dosis	Algoritmo Farmacogenético	Algoritmo Clínico	Diferencia	Valor p
Bajo (≤ 11 mg)				
% Correctamente clasificados	32,4 %	19,9 %	12,5%	<0,001
MAE media (DE)	3,12 (2,32)	4,37 (2,78)	1,25 (3,01)	<0,001
IC 95%			0,85 – 1,66	
Medio (11–21 mg)				
% Correctamente clasificados	58,1 %	54,5 %	3,6%	0,118
MAE media (DE)	3,01 (2,32)	3,15 (2,36)	0,14 (2,97)	0,403
IC 95%			0,18 – 0,45	
Alto (≥ 21 mg)				
% Correctamente clasificados	41,4 %	6,3 %	34,8%	<0,001
MAE media (SD)	6,64 (5,26)	10,92 (5,93)	4,28 (3,76)	<0,001
IC 95%			3,62 – 4,93	

Abreviaturas: IC, Intervalo de Confianza; MAE, error absoluto medio ($= \text{SQR}[(\text{predicho}-\text{observado})^2]$); DE, desviación estándar.

6.2 Evaluación de la posible influencia de 2 polimorfismos del POR (POR*28 y rs2868177) en la dosis estable de acenocumarol.

“Influence of two variants of CYP450 oxidoreductase on the stable dose of acenocoumarol in a Spanish population”

Hoi Y Tong, Alberto M Borobia, José Carlos Martínez Ávila, Rubin Lubomirov, Mario Muñoz, María J Blanco Bañares, Rafael Hernández, Carmen Fernández Capitán, Elena Ramírez, Jesús Frías, Antonio J Carcas.

Pharmacogenomics. 2017 Jun;18(8):797-805. doi: 10.2217/pgs-2017-0021

Este trabajo responde al objetivo general 1 y objetivo específico 1.

EVALUACIÓN DE LA POSIBLE INFLUENCIA DE 2 POLIMORFISMOS DEL POR (POR*28 Y RS2868177) EN LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Un total de 340 pacientes caucásicos fueron reclutados desde varios departamentos del Hospital Universitario La Paz y un centro de atención primaria de referencia entre los años 2008 y 2013. Los pacientes estaban recibiendo un tratamiento anticoagulante estable con acenocumarol para la FA, ETEV y/o RV.

Todos los pacientes incluidos estaban recibiendo una dosis estable de acenocumarol (variación semanal de la dosis <20% en los últimos 3 meses) y tenían un cociente internacional normalizado (INR) dentro del rango de 2-3 (FA y ETEV) o 2,5-3,5 (RV) durante al menos los 3 meses consecutivos anteriores.

Los criterios de exclusión incluían la insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina calculado aclaramiento de creatinina ≤ 30 ml/min), enfermedad hepática (estadio C de Child Pugh), disfunción tiroidea y cáncer.

Para cada paciente, los datos obtenidos incluían la edad, el sexo, la etnia, peso y estatura (e IMC calculado), resultados del INR, dosis de acenocumarol administrada en los últimos 3 meses y la medicación concomitante (amiodarona y estado del inductor enzimático). Se recogió una muestra de sangre para la determinación de CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, APOE y las dos variantes del POR, y se almacenó a -20°C antes de aislar el ADN. Todos los procedimientos se realizaron durante una visita del paciente a la clínica para medición del INR.

Para evaluar la influencia de ambos SNPs del POR, se aplicó el algoritmo farmacogenético desarrollado y publicado por nuestro grupo e incluido en esta tesis.

Genotipado

El CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), VKORC1 (-1639 G→A rs9923231), CYP4F2 (rs2108622) y APOE (8016 C→T rs7412), las técnicas de genotipado utilizadas han sido publicadas previamente (58). Los dos nuevos SNPs del gen POR (rs2868177 y rs1057868 [POR*28]) fueron genotipados utilizando la tecnología Taqman® (Applied Biosystems©, CA, EE.UU.).

Análisis estadístico

Se utilizó una prueba χ^2 de bondad de ajuste para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución normal de las variables continuas. Los resultados de frecuencia se expresan en términos absolutos, como porcentajes e intervalo de confianza. Las variables continuas son expresadas como media (desviación estándar) o mediana (rango) según la prueba de normalidad. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas con un valor p significativo de $<0,05$.

Se realizó un análisis univariante para evaluar la influencia de los polimorfismos POR*28 y POR (rs2868177) sobre la dosis estable de acenocumarol, y se realizó un análisis de regresión lineal multivariante para evaluar la variabilidad de la dosis estable de acenocumarol con y sin ambos polimorfismos POR.

Se utilizaron las mismas variables demográficas, clínicas y genéticas incluidas en nuestro algoritmo, obteniendo el coeficiente de determinación (R^2) y el criterio de información de Akaike (AIC) para evaluar la mejora potencial proporcionada por la inclusión de los polimorfismos del POR (76).

Todos estos análisis se realizaron utilizando el entorno estadístico R (77) con RStudio (78).

Resultados

Se reclutaron un total de 340 pacientes caucásicos. De ellos, el 48% eran varones y la edad media era de 69,83 (13,62) años; el IMC medio fue de 28,15 (4,46). La principal indicación clínica para la anticoagulación fue la ETEV (43,2%), seguida de la FA (36,2%). Las características demográficas y clínicas de las poblaciones estudiadas se muestran en la tabla 12. También se muestran las frecuencias de las variables genotípicas. No se obtuvieron resultados de POR*28 para un paciente.

Las frecuencias de los genotipos de POR*28 fueron las siguientes: 122 individuos (36%) eran heterocigotos (POR*1/*28) y 21 pacientes (6,2%) eran homocigotos mutados (POR*28/*28). Para el SNP rs2868177, había 148 individuos heterocigotos (43,5%) y 25 pacientes eran homocigotos mutados (7,3%); estas frecuencias no difieren de las reportado en la literatura (79). Las frecuencias alélicas de los SNPs estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 13. Características demográficas, clínicas y genotipo de los pacientes incluidos.

Variables	n = 340
Sexo [n (%)]	
Hombre	165 (48,5)
Mujer	175 (51,5)
Edad, en años [media (DE)]	69,83 (13,62)
Peso, en kilogramos [media (DE)]	73,66 (14,09)
Estatura, en metros [media (DE)]	1,62 (9,52)
Índice de Masa Corporal (IMC), en kg/m ² [media (DE)]	28,15 (4,46)
Enfermedad de base [n (%)]	
Enfermedad tromboembólica venosa (ETEV)	147 (43,2)
Fibrilación auricular (FA)	123 (36,2)
Reemplazo valvular (RV)	70 (20,6)
Dosis semanal de acenocumarol [media (DE)]	14,93 (6,66)
Tratamiento concomitante [n (%)]	
Inductores enzimáticos ^{†‡}	9 (2,7)
Amiodarona [‡]	13 (3,8)
Fenotipo [n (%)]	
≤11 mg/semana	116 (34,1)
11–21 mg/semana	158 (46,5)
≥21 mg/semana	66 (19,4)
<i>CYP2C9</i> [n (%)]	
*1/*1	201 (59,1)
*1/*2	93 (27,4)
*1/*3	35 (10,3)
*2/*2	6 (1,8)
*2/*3	5 (1,5)
<i>VKORCI</i> [n (%)]	
Homocigoto wt/wt	120 (35,3)
Heterocigoto	168 (49,4)
Homocigoto mut/mut	52 (15,3)
<i>CYP4F2</i> [n (%)]	
MM	45 (13,2)
<i>APOE</i> rs7412 [n (%)]	
Homocigoto wt/wt	300 (88,2)
Heterocigoto	37 (10,9)
Homocigoto mut/mut	3 (0,9)
POR*28 (rs1057868) [n (%)] [§]	
Homocigoto wt/wt	196 (57,8)
Heterocigoto	122 (36)
Homocigoto mut/mut	21 (6,2)
POR (rs2868177) [n (%)]	
Homocigoto wt/wt	167 (49,1)
Heterocigoto	148 (43,5)
Homocigoto mut/mut	25 (7,3)

[†]Los inductores enzimáticos que fueron considerados en este análisis incluía la fenitoína, carbamazepina y rifampicina.

[‡] Datos perdidos, n=338

[§] Datos perdidos, n=339

DE: Desviación estándar

Análisis univariante

La dosis estable de acenocumarol no varió significativamente entre los genotipos POR*28 [14,7 (6,90) mg/semana en POR*1/*1, 15,7 (6,2) mg/semana en POR*1/*28 y 13,5 (6,5) mg/semana en POR *28/*28; (p = 0,247)]. Tampoco hubo diferencias significativas en la dosis estable entre los portadores de las tres variantes del POR rs2868177 [(AA: 15,3 (6,7) mg/semana, AG: 14,7 (6,6) mg/semana y GG: 13,8 (6,4) mg/semana; (p = 0,526)]. Tras el análisis de regresión lineal simple tampoco se encontró ninguna asociación entre la dosis estable de acenocumarol y los genotipos de polimorfismos del POR*28 (*1/*1; *1/*28, *28/*28; p = 0,469) o los polimorfismos del POR rs2868177 (WT/WT, WT/MUT, MUT/MUT; p = 0,199).

También se evaluó la influencia de los polimorfismos del POR*28 o POR rs2868177 anidados en los distintos genotipos de CYP2C9 sobre la dosis estable de acenocumarol con el objetivo de observar cualquier interacción (Tablas 13 y 14).

Tabla 14. Efecto del POR*28 sobre las variantes del CYP2C9 en la dosis real de acenocumarol. Análisis univariante.

CYP2C9	POR*28	N	Dosis media real	DE	IC 95%	Valor p
CYP2C9 *1/*1	POR*1/*1	116	16,06	6,97	14,78-17,35	0,664
	POR*1/*28	73	16,37	5,93	14,98-17,75	
	POR*28/*28	11	14,44	6,59	10,01-18,87	
	TOTAL	200	16,09	6,57	15,17-17,00	
CYP2C9 *1/*2	POR*1/*1	53	14,03	6,59	12,21-15,85	0,129
	POR*1/*28	35	15,87	6,58	13,63-18,16	
	POR*28/*28	5	10,10	3,81	5,36-14,84	
	TOTAL	93	14,52	6,57	13,17-15,87	
CYP2C9 *1/*3	POR*1/*1	20	10,62	4,79	8,38-12,87	0,146
	POR*1/*28	11	11,09	4,93	7,78-14,40	
	POR*28/*28	4	16,50	8,89	2,36-30,64	
	TOTAL	35	11,44	5,51	9,55-13,34	
CYP2C9 *2/*2	POR*1/*1	3	11,00	1,00	8,51-13,48	0,499
	POR*1/*28	2	16,50	9,19	-66,09-99,09	
	POR*28/*28	1	9,00			
	TOTAL	6	12,50	5,24	6,99-18,00	
CYP2C9 *2/*3	POR*1/*1	4	5,13	2,17	1,66-8,59	0,497
	POR*1/*28	1	7,00			
	TOTAL	5	5,50	2,06	2,94-8,06	

DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de Confianza

Tabla 15. Efecto del POR rs2868177 sobre las variantes del CYP2C9 en la dosis real de acenocumarol. Análisis univariante

CYP2C9	rs2868177	N	Dosis medio real	DE	IC 95%	Valor p
CYP2C9 *1/*1	POR*1/*1	96	16,50	6,81	15,12-17,88	0,626
	POR*1/*28	87	15,67	6,51	14,28-17,06	
	POR*28/*28	18	15,33	5,96	12,37-18,30	
	TOTAL	201	16,04	6,59	15,12-16,95	
CYP2C9 *1/*2	POR*1/*1	50	14,46	6,28	12,68-16,24	0,841
	POR*1/*28	39	14,78	7,02	12,50-17,05	
	POR*28/*28	4	12,75	7,04	1,55-23,95	
	TOTAL	93	14,52	6,57	13,17-15,87	
CYP2C9 *1/*3	POR*1/*1	14	12,25	6,32	8,60-15,90	0,239
	POR*1/*28	18	11,67	4,88	9,24-14,10	
	POR*28/*28	3	6,33	3,22	-1,66-14,33	
	TOTAL	35	11,44	5,51	9,55-13,34	
CYP2C9 *2/*2	POR*1/*1	4	13,50	6,45	3,23-23,77	0,570
	POR*1/*28	2	10,50	0,71	4,14-16,86	
	TOTAL	6	12,50	5,24	6,99-18,00	
CYP2C9 *2/*3	POR*1/*1	3	6,67	0,58	5,24-8,10	0,124
	POR*1/*28	2	3,75	2,47	-18,49-25,99	
	TOTAL	5	5,50	2,06	2,94-8,06	

DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de Confianza

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la dosis media de acenocumarol entre las diferentes variantes del CYP2C9 y polimorfismos de ambos POR. Por lo tanto, la diferencia observada entre los polimorfismos de CYP2C9 fue independiente de la presencia de estos polimorfismos del POR.

Análisis multivariante

Se realizó un análisis de regresión multivariante utilizando la dosis estable semanal de acenocumarol transformada en logaritmo como variable independiente; como variables dependientes se incluyeron las mismas variables demográficas, clínicas y genéticas incluidas en el algoritmo desarrollado por nuestro grupo incluido en esta tesis. En este análisis multivariante, el POR*1/*28 arrojó un valor p significativo en el modelo. El coeficiente de determinación obtenido sin la inclusión de POR*28 fue del 51,5%, y tras de incluir los polimorfismos POR*28, la R² aumentó a 52%; los valores de AIC fueron 234,22 y 230,58, respectivamente (Tabla 15). En cuanto al POR rs2868177, no fue significativo en el modelo, y su inclusión no modificó el coeficiente de determinación (R² del 51,5%), mientras que el valor del AIC fue mayor (236,74) (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de regresión multivariante utilizando las mismas variables incluidas en el algoritmo farmacogenético añadiendo variantes del POR*28.

	Beta	Variable	Valor p	AIC	R ² ajustada (%)
Intercept	3,205				
VARIABLES CLÍNICAS				423,42	13,7
	-0,010	Edad	<0,001		
	0,005	Peso	0,001		
	0,177	Uso de inductor enzimático	0,123		
	-0,269	Uso de amiodarona	0,008		
	0,020	INR objetivo	0,677		
VARIABLES GENÉTICAS				234,22	51,5
	-0,086	CYP2C9 *1/*2	0,044		
	-0,282	CYP2C9 *1/*3	<0,001		
	-0,568	CYP2C9 *2/*2 or CYP2C9*2/*3	<0,001		
	-0,263	VKORC1 A/G (WT/MUT)	<0,001		
	-0,794	VKORC1 A/A (MUT/MUT)	<0,001		
	0,212	CYP4F2 MM	<0,001		
POR*28				230,58	52,0
	0,081	*1/*28 (WT/MUT)	0,041		
	-0,038	*28/*28 (MUT/MUT)	0,627		

Beta: coeficiente de regresión estandarizada

Algoritmo farmacogenético: logaritmo natural de la dosis semanal de acenocumarol = 3,205 – (0,010*edad) + (0,005*peso) + 0,177 (si usa inductor enzimático) – 0,269 (si usa amiodarona) + 0,020 (si el INR objetivo es >2,5) – 0,086 (si CYP2C9*1/*2) – 0,282 (si CYP2C9*1/*3) – 0,568 (si CYP2C9 homocigoto mutado) – 0,263 (si VKORC1 A/G) – 0,794 (si VKORC1 A/A) + 0,212 (si CYP4F2 MM) + 0,081 (si POR*1/*28) – 0,038 (si POR*28/*28).

Tabla 17. Análisis de regresión multivariante utilizando las mismas variables incluidas en el algoritmo farmacogenético añadiendo variantes del POR (rs2868177)

	Beta	Variable	Valor p	AIC	R ² ajustado (%)
Intercept	3,236				
VARIABLES CLÍNICAS				423,42	13,7
	-0,010	Edad	<0,001		
	0,005	Peso	0,001		
	0,182	Uso de inductor enzimático	0,115		
	-0,337	Uso de amiodarona	0,001		
	0,035	INR objetivo	0,464		
VARIABLES GENÉTICAS				234,22	51,5
	-0,085	CYP2C9 *1/*2	0,047		
	-0,285	CYP2C9 *1/*3	<0,001		
	-0,577	CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	<0,001		
	-0,262	VKORC1 A/G	<0,001		

	-0,797	VKORC1 A/A	<0,001		
	0,224	CYP4F2 MM	<0,001		
POR (rs2868177)				236,74	51,5
	-0,018	WT/MUT	0,640		
	-0,087	MUT/MUT	0,239		

Beta: coeficiente de regresión estandarizado

Algoritmo farmacogenético: logaritmo natural de la dosis media semanal de acenocumarol = 3,236 – (0,010*edad) + (0,005*peso) + 0,182 (si usa inductor enzimático) – 0,337 (si usa amiodarona) + 0,035 (si INR objetivo es >2,5) – 0,085 (si CYP2C9*1/*2) – 0,285 (si CYP2C9*1/*3) – 0,577 (si CYP2C9 homocigoto mutado) – 0,262 (si VKORC1 A/G) – 0,797 (si VKORC1 A/A) + 0,224 (si CYP4F2 MM) - 0,018 (si POR WT/MUT) – 0,087 (si POR MUT/MUT)

Relevancia clínica

Para evaluar la relevancia clínica, clasificamos los pacientes en los tres grupos de dosis: baja (≤ 11 mg/semana), intermedia (11-21 mg/semana) y alta (≥ 21 mg/semana), y para cada grupo se calculó el porcentaje de pacientes clasificados correctamente dentro del 20% de la dosis estable.

El mayor número de pacientes correctamente clasificados se encontraba en el grupo de dosis intermedia (52,5%), seguido de los pacientes con dosis baja y por último, el grupo de dosis alta (38,8 y 31,8%, respectivamente). Tras inclusión de los polimorfismos POR*28 en el algoritmo, el porcentaje de pacientes correctamente clasificados se mantuvo casi sin cambios en los grupos de dosis extremas (37,9 y 30,3%, respectivamente), mientras que, en el grupo de dosis intermedia, el número de pacientes clasificados correctamente aumentó en un 7% (del 52,5 a 59,5%; $p = 0,016$) (Tabla 17).

Tabla 18. Porcentaje de pacientes correctamente clasificados de acuerdo con el fenotipo (dosis predicha dentro del $\pm 20\%$ de la dosis actual), utilizando el algoritmo farmacogenético incluyendo y sin incluir los polimorfismos del POR*28

Fenotipo	Algoritmo farmacogenético sin incluir POR*28	Algoritmo farmacogenético incluyendo POR*28	Diferencia	Valor p
Bajo (≤ 11 mg/semana)	38,8%	37,9%	-0,9	0,764
Medio (11–21 mg/semana)	52,5%	59,5%	7,0	0,016
Alto (≥ 21 mg/semana)	31,8%	30,3%	-1,5	0,658

6.3 Influencia del CYP4F2, VKORC1 y CYP2C9 en la dosis de cumarina: un metaanálisis de datos de pacientes individuales en más de 15.000 individuos.

Effect of CYP4F2, VKORC1, and CYP2C9 in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals.

Elisa Danese, Sara Raimondi, Martina Montagnana, Angela Tagetti, Taimour Langae, Paola Borgiani, Cinzia Ciccacci, Antonio J. Carcas, Alberto M. Borobia, Hoi Y. Tong, Cristina Dávila-Fajardo, Mariana Rodrigues Botton, Stephane Bourgeois, Panos Deloukas, Michael D. Caldwell, Jim K. Burmester, Richard L. Berg, Larisa H. Cavallari, Katarzyna Drozda, Min Huang, Li-Zi Zhao, Han-Jing Cen, Rocio Gonzalez-Conejero, Vanessa Roldan, Yusuke Nakamura, Taisei Mushiroda, Inna Y. Gong, Richard B. Kim, Keita Hirai, Kunihiko Itoh, Carlos Isaza, Leonardo Beltrán, Enrique Jiménez-Varo, Marisa Cañadas-Garre, Alice Giontella, Marianne K. Kringen, Kari Bente Foss Haug, Hye Sun Gwak, Kyung Eun Lee, Pietro Minuz, Ming Ta Michael Lee, Steven A. Lubitz, Stuart Scott, Cristina Mazzaccara, Lucia Sacchetti, Ece Genç, Mahmut Özer, Anil Pathare, Rajagopal Krishnamoorthy, Andras Paldi, Virginie Siguret, Marie-Anne Lorient, Vijay Kumar Kutala, Guilherme Suarez-Kurtz, Jamila Perini, Josh C. Denny, Andrea H. Ramirez, Balraj Mittal, Saurabh Singh Rathore, Hersh Sagreiya, Russ Altman, Mohamed Hossam A. Shahin, Sherief I. Khalifa, Nita A. Limdi, Charles Rivers, Aditi Shendre, Chrisly Dillon, Ivet M. Suriapranata, Hong-Hao Zhou, Sheng-Lan Tan, Vacis Tatarunas, Vaiva Lesauskaite, Yumao Zhang, Anke H. Maitland-van der Zee, Talitha I. Verhoef, Anthonius de Boer, Monica Taljaard, Carlo Federico Zambon, Vittorio Pengo, Jieying Eunice Zhang, Munir Pirmohamed, Julie A. Johnson, and Cristiano Fava.

Clinical Pharmacology & Therapeutics, Factor de Impacto. 6.565 (2020); Q1

Este trabajo responde al objetivo general 1 y objetivo específico 1.

Este metaanálisis forma parte de un estudio colaborativo internacional.

INFLUENCIA DEL CYP4F2, VKORC1 Y CYP2C9 EN LA DOSIS DE CUMARINA: UN METAANÁLISIS DE DATOS DE PACIENTES INDIVIDUALES EN MÁS DE 15.000 INDIVIDUOS.

Materiales y métodos

A partir de un metaanálisis previo compuesto por 30 artículos, se hizo una nueva búsqueda arrojando un total de 38 nuevos artículos que cumplieran con los criterios de inclusión. El número de pacientes final incorporados en el estudio fue de 15.754 pacientes. Los 68 estudios evaluados para su inclusión habían realizado el genotipado de CYP4F2 en combinación con CYP2C9 y/o VKORC1 en pacientes tratados con cumarina.

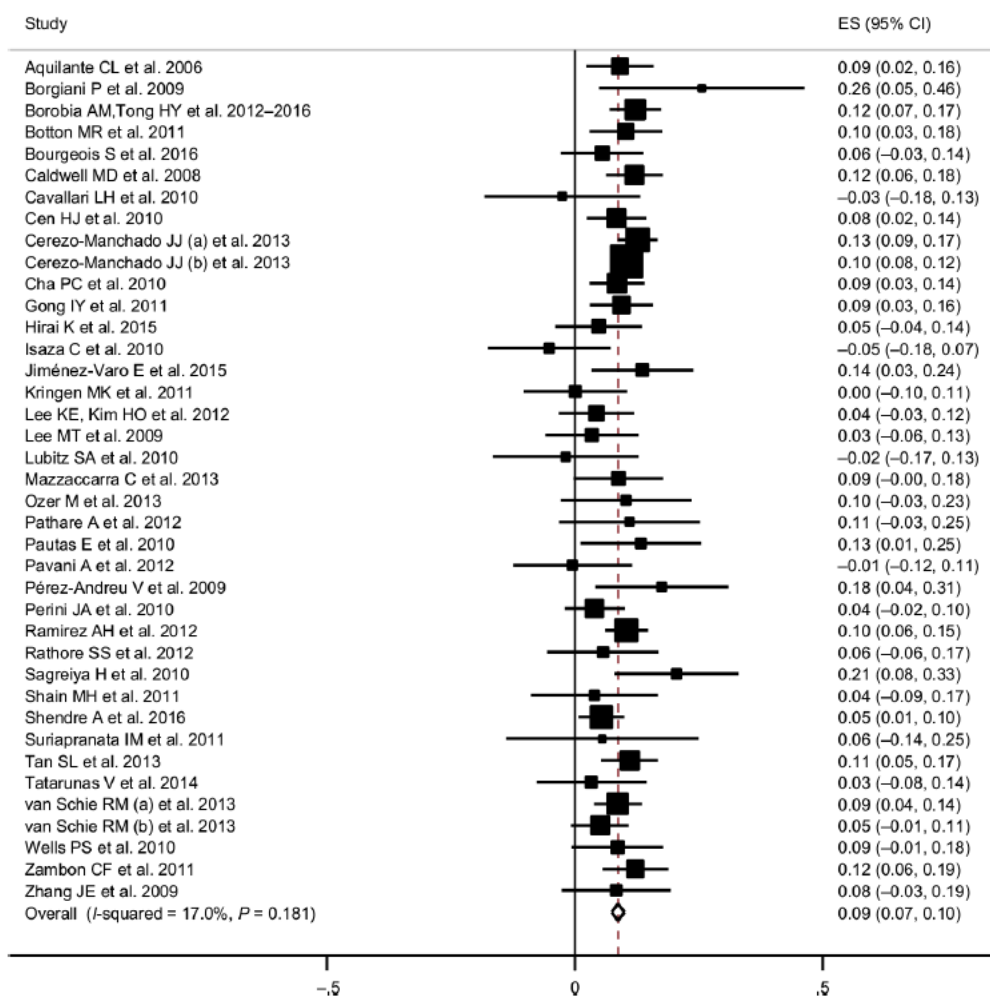
Los autores que estaban dispuestos a colaborar en este metaanálisis colaborativo fueron finalmente incluidos si su base de datos original contenía los siguientes datos obligatorios para pacientes individuales: sexo, edad, etnia, genotipos, indicación del tratamiento con cumarina, objetivo de INR, tipo de cumarina utilizada y dosis de mantenimiento. También se registró información adicional sobre el peso corporal, la estatura y el uso de fármacos concomitantes cuando se disponía de ella.

Se realizó un análisis de dos etapas para la asociación entre el polimorfismo CYP4F2*3 (rs2108622; 1347C>T) y la dosis estable de cumarina. Se calculó las estimaciones específicas del estudio, con los IC del 95%, para la diferencia en la dosis logarítmica de cumarina para los sujetos con al menos un alelo T del CYP4F2 (CT + TT) en comparación con los sujetos de tipo salvaje (CC), según un modelo dominante. También se calcularon estimaciones separadas para los genotipos CT y TT como análisis de sensibilidad. Estas estimaciones específicas para cada estudio se obtuvieron ajustando modelos lineales generales con la dosis logarítmica de cumarina como variable dependiente y el polimorfismo CYP4F2*3 como variable independiente. Todos los modelos se ajustaron a las covariables específicas de cada estudio, como la edad, el sexo, la raza, el IMC, el hábito de fumar, la indicación del tratamiento con cumarina, el objetivo de INR, los fármacos concomitantes, los polimorfismos CYP2C9*2 y *3 y el polimorfismo VKORC1.

Resultados

La figura 3 muestra el diagrama de bosque (forest plot) para la diferencia en la dosis logarítmica de cumarina para los sujetos con al menos un alelo T (CT + TT) CYP4F2 en comparación con los sujetos de tipo salvaje (CC), según un modelo dominante. El tamaño del efecto estimado

fue de 0,09 (IC 95%: 0,07-0,10), lo que corresponde a un aumento del 9 % en mg/semana (IC del 95%: 7-10%).



IC=Intervalos de confianza; ES=Estimación

* exp(ES) da la diferencia porcentual relativa como dosis semanal en mg

Figura 3. Diagrama de bosque para la diferencia en el logaritmo de la dosis estable de cumarina* para los sujetos con polimorfismo del CYP4F2 (CT + TT) en comparación con los sujetos con CYP4F2 de tipo salvaje (CC), según el modelo dominante.

6.4 Ensayo clínico para la evaluación de la efectividad y seguridad del uso de un algoritmo de dosificación de Acenocumarol que incorpora variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa

“Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithm versus Usual Care in Patients with Venous Thromboembolism: A Randomised Clinical Trial”

Hoi Yan Tong, Alberto M, Borobia, Manuel Quintana-Díaz, Sara Fabra, Manuel González-Viñolis, Carmen Fernández-Capitán, María A, Rodríguez-Dávila, Alicia Lorenzo, Ana María López-Parra, Nuria Ruiz-Giménez, Francisco Abad-Santos, Carmen Suarez, Olga Madridano, Jorge Francisco Gómez-Cerezo, Pilar Llamas, Carlos Baeza-Richer, Eduardo Arroyo-Pardo, Antonio J, Carcas and The PGX-ACE Spanish Investigators Group.

Journal of Clinical Medicine, 2021 Jun 30;10(13):2949, doi: 10.3390/jcm10132949

Este trabajo responde al objetivo general 2 y objetivos específicos 2 y 3.

ENSAYO CLÍNICO PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DEL USO DE UN ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE DOSIFICACIÓN DE ACENOCUMAROL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Entre marzo de 2011 y septiembre de 2013, se llevó a cabo un ensayo clínico pragmático, multicéntrico, aleatorizado, paralelo, de dos brazos, como se ha descrito previamente (73). El estudio fue aprobado por el CEIC del Hospital Universitario La Paz y por la AEMPS, registrado en EudraCT (número: 2009-016643-18).

Población del estudio

La población del estudio estaba formada por pacientes con ETEV de reciente diagnóstico, incluyendo TEP y TVP, que iniciaban tratamiento con acenocumarol. Los criterios de inclusión y exclusión se han descrito previamente (73). El estudio se autorizó para ser realizado en 5 hospitales de la Comunidad de Madrid, España; sin embargo, uno de los hospitales no inició el reclutamiento, por lo que quedaron 4 hospitales participantes: Hospital Universitario La Paz, el Hospital Universitario de La Princesa, el Hospital Infanta Sofía y la Fundación Jiménez Díaz. Los pacientes fueron reclutados en los servicios de Medicina Interna y de Urgencias de estos centros, y todos los participantes dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Aleatorización y tratamiento

Tras la inclusión en el ensayo clínico, los pacientes fueron asignados aleatoriamente en una proporción de 1:1 a uno de los dos brazos - ajuste de dosis mediante el algoritmo farmacogenético (PGx) o ajuste estándar (control). La aleatorización se realizó mediante un esquema de aleatorización enmascarado, en bloques de 4 pacientes y estratificada por centro, utilizando un programa de Microsoft Excel.

Se crearon sobres de aleatorización con la estrategia asignada para cada centro con el código del paciente escrito en el exterior de estos sobres. Tanto el sobre como la tarjeta se guardaron en el archivo del investigador principal. El subinvestigador responsable del reclutamiento se encargó de abrir los sobres según el código del paciente.

Inicialmente, a todos los pacientes se les administró una dosis estándar de acenocumarol junto con heparina de bajo peso molecular (HBPM). Al tercer o cuarto día de tratamiento (día 0 del estudio), se realizó el ajuste de dosis según el grupo asignado:

- Grupo PGx: La dosis se calculó mediante el algoritmo farmacogenético, que incluía datos demográficos (edad, sexo, peso y estatura), clínicos (uso de amiodarona o fármacos inductores) y farmacogenéticos (polimorfismos de CYP2C9, VKORC1, APOE y CYP4F2) (58).
- Grupo control: La dosis se ajustó de acuerdo con el procedimiento estándar en la práctica clínica habitual. Como pauta para el manejo y ajuste de las dosis, los investigadores emplearon la pauta local desarrollada para el manejo de los pacientes tratados con acenocumarol.

Procedimientos del estudio

Los pacientes que aceptaron participar en este ensayo clínico tuvieron que realizar un total de 8 visitas en un periodo de 12 semanas (Tabla 18).

Tabla 19. Procedimientos del estudio

Visita	1	2	3	4	5	6	7	8
Día del estudio	-3 or -2	0	3	7	15	30	60	90
Ventana (día)	0	0	0	+/-1	+/-3	+/-5	+/-7	+/-7
Reclutamiento	√							
Consentimiento Informado	√							
Criterios de selección	√							
Antecedente clínico	√							
Exploración física	√							√
Muestra de sangre para farmacogenética	√							
Aleatorización	√							
Inicio de la dosis de acenocumarol	√							
Ajuste de la dosis de acenocumarol		√	√	√	√	√	√	√
Determinación del INR		√	√	√	√	√	√	√
Evaluación de eventos adversos		√	√	√	√	√	√	√

Abreviaturas: INR, Razón Normalizada Internacional.

Los pacientes con ETEV recién diagnosticada se identificaban desde el servicio de urgencias o de la sala de hospitalización dentro de las primeras 48 horas del diagnóstico. Los

pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión fueron invitados a participar en el estudio.

Antes de someterse a cualquier procedimiento del estudio, se confirmó que los pacientes habían firmado el consentimiento informado.

El día del reclutamiento (días 3 o 2), todos los pacientes comenzaron el tratamiento con acenocumarol según la práctica clínica habitual. El enfoque recomendado fue comenzar con 2 mg al día para los pacientes menores de 65 años y 1 mg al día para los pacientes de más edad o con algún factor de riesgo hemorrágico. En todos los casos, a los pacientes se les administró HBPM, al menos hasta que el INR estuviera dentro del rango terapéutico. El día del reclutamiento, se extrajo una muestra de sangre (2 tubos de ácido etilendiaminotetraacético de 5 mL) y enviada para genotipado. Los resultados farmacogenéticos se devolvieron en 48 horas.

Genotipado

El genotipado fue realizado por el Laboratorio de Genética Poblacional y Forense del Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, según una técnica multiplex previamente descrito (72). El genotipado incluyó la determinación de CYP2C9*2 (C → T = rs1799853), CYP2C9*3 (A → C = rs1057910), VKORC1 (3588 G → A = rs9923231), CYP4F2 (23454 G → A = rs2108622) y APOE (8041 C → T = rs7412).

A partir de la visita del día 0, se determinó el INR de una muestra de sangre capilar con un coagulómetro portátil CoaguChek® (Roche Farma SA, Madrid, España), y la dosis se ajustó según el grupo al que se había asignado el paciente.

Todos los pacientes fueron seguidos durante 3 meses, midiéndose su INR en los días 3, 7, 15, 30 60 y 90 del estudio, Si era necesario, se podían organizar visitas adicionales no programadas.

Los acontecimientos adversos se registraron en cada visita mediante preguntas abiertas, exploración física y la notificación espontánea por parte de los pacientes. Se empleó el algoritmo de Naranjo para evaluar la causalidad (80). Se consideraron eventos adversos de especial interés la re-trombosis y la hemorragia.

Variables del estudio

La variable principal del estudio fue el porcentaje de pacientes con un INR dentro de rango terapéutico (INR entre 2 y 3) en el día 7 tras el inicio del tratamiento (visita 3). Las otras variables principales fueron: (a) el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con acenocumarol hasta alcanzar un INR estable dentro del intervalo terapéutico (INR dentro del rango terapéutico en 3 mediciones consecutivas con un intervalo de al menos 2 semanas, con una diferencia máxima entre las dosis medias diarias del 10%); (b) el número de INRs dentro del rango en las primeras 6 semanas de tratamiento; y (c) el número de INRs dentro del rango durante los 3 meses del estudio. Las variables secundarias fueron la proporción de tiempo dentro del rango terapéutico desde el inicio del tratamiento hasta el final del seguimiento; el número de mediciones adicionales de INR durante el estudio; y la proporción de acontecimientos adversos hasta el final del seguimiento.

Análisis estadístico

Se calculó el tamaño muestral para detectar una diferencia absoluta del 20% en el número de pacientes dentro del rango terapéutico el día 7 (visita 3) después de iniciar el tratamiento con acenocumarol. Considerando un error alfa y beta de 0,05 y 0,2, respectivamente, y asumiendo una tasa del 20% de pacientes perdidos durante el seguimiento, el número de pacientes necesarios era de 120 por grupo de estudio.

Se definieron 3 poblaciones de análisis: la población por intención de tratar (ITT), definida como todos los participantes aleatorizados que cumplían los criterios de selección, tomaban la medicación del estudio y tenían al menos 1 medición de la variable principal de eficacia (INR); la población por protocolo (PP), compuesta por todos los participantes aleatorizados que cumplían los criterios de inclusión, tomaban la medicación del estudio, tenían al menos 1 medición de la variable principal de eficacia (INR) y no faltaron a más de 1 visita o a la última visita; y la población de seguridad, definida como todos los participantes aleatorizados que tomaron al menos 1 dosis de tratamiento. El análisis del estudio principal se realizó utilizando la estrategia ITT.

Para todas las variables de eficacia primaria y secundaria relacionadas con el número de eventos (el número de INRs dentro del rango terapéutico durante las primeras 6 semanas de tratamiento, el número de INRs dentro del rango terapéutico al final del tratamiento, las determinaciones extraordinarias de INRs, el número de INRs <1,5 y el número de INRs >4), se emplearon pruebas no paramétricas. Se comparó la mediana (IC del 95%) y las diferencias de

la mediana (IC del 95%) utilizando las estimaciones de Hodges-Lehmann mediante la prueba de Mann-Whitney y el análisis de Poisson.

Se estimó el tiempo hasta el evento (estabilización del INR) mediante el enfoque de Kaplan-Meier y se compararon los tratamientos empleando modelos de regresión de Cox para estimar los riesgos y el IC del 95%. Se estimó la proporción de tiempo dentro del rango terapéutico mediante interpolación lineal y se compararon los tratamientos mediante la prueba t de Student.

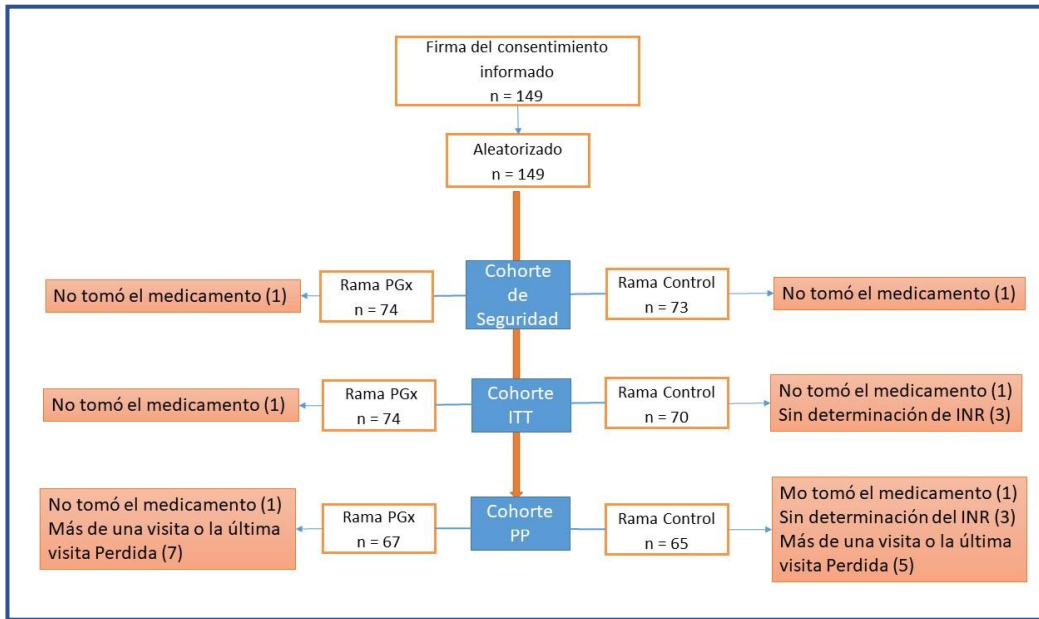
Todas las pruebas estadísticas se aplicaron con un nivel de significación de 0,05 a dos colas. Se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para calcular las frecuencias alélicas y se realizó el análisis de seguridad utilizando el número de acontecimientos adversos notificados durante el estudio, incluido el número de INRs >4 o $<1,5$, aplicando la prueba de chi-cuadrado.

El análisis estadístico se realizó con SAS (versión 9.2).

Resultados

Pacientes

Se reclutaron 149 pacientes, 75 de los cuales fueron asignados al grupo de PGx y 74 de los cuales fueron asignados al grupo de control (Figura 4). No se alcanzó el tamaño muestral calculado debido a la baja tasa de reclutamiento. La población ITT estaba conformada por 144 pacientes (74 en el grupo de PGx y 70 en el grupo de control). Todos los resultados de eficacia comunicados proceden del grupo ITT, cuya media de edad fue de 59,42 (18,53) años. Se reclutaron 77 (53,5%) hombres y 67 (46,5%) mujeres. El diagnóstico fue TVP en el 61,8% de los pacientes, TEP en el 22,2% y ambos diagnósticos en el 16%. La tabla 19 muestra los datos demográficos. Las frecuencias genéticas se presentan en equilibrio de Hardy-Weinberg.



Abreviaturas: ITT, intención de tratar; PP, por protocolo; PGx, algoritmo farmacogenético.

Figura 4. Diagrama de flujo de pacientes incluidos

Tabla 20. Datos basales de los pacientes incluidos

Parameter	Grupo PGx (n = 74)	Grupo Control (n = 70)	Total (n = 144)
Edad, años	60,12 (19,4)	58,67 (17,7)	59,42 (18,5)
Hombre, n (%)	44 (59,5)	33 (47,1)	77 (53,5)
Raza, n (%)			
Blanco/Asiático	73 (98,6) / 1 (1,4)	70 (100) / 0 (0)	143 (99,3) / 1 (0,7)
Hospitalización, n (%)	31 (41,9)	32 (45,7)	63 (43,8)
Duración de hospitalización, días	6,33 (4,15)	6,16 (3,03)	6,25 (3,59)
TEP, n (%)	18 (24,3)	14 (20,0)	32 (22,2)
TVP, n (%)	48 (64,9)	41 (58,6)	89 (61,8)
Ambos TVP y TEP, n (%)	8 (10,8)	15 (21,3)	23 (16)
Estatura, cm	165,77 (11)	165,99 (11,1)	165,92 (11,1)
Peso, kg	78,44 (16,4)	78,59 (16,4)	78,57 (16,4)
IMC	28,55 (5,3)	28,53 (5,3)	28,55 (5,2)
Uso de amiodarona	1 (1,4)	0 (0)	1 (0,7)
Uso de inductor enzimático	2 (2,7)	0 (0)	2 (1,4)
CYP2C9, n (%)			
*1*1	52 (70,3)	43 (61,4)	95 (66,0)
*1*2	14 (18,9)	14 (20,0)	28 (19,4)
*1*3	6 (8,1)	5 (7,1)	11 (7,6)
*2*2	1 (1,4)	5 (7,1)	6 (4,2)
*2*3	1 (1,4)	2 (2,9)	3 (2,1)
*3*3	0	1 (1,4)	1 (0,7)
VKORC1, n (%)			
GG	31 (41,9)	24 (34,3)	55 (38,2)
GA	31 (41,9)	40 (57,1)	71 (49,3)
AA	12 (16,2)	6 (8,6)	18 (12,5)

CYP4F2, n (%)			
CC	27 (36,5)	20 (28,6)	47 (32,6)
CT	37 (50,0)	39 (55,7)	76 (52,8)
TT	10 (13,5)	11 (15,7)	21 (14,6)
APOE176, n (%)			
CCxs	61 (82,4)	64 (91,4)	125 (86,8)
CT	13 (17,6)	5 (7,1)	18 (12,5)
TT	0	1 (1,4)	1 (0,7)

Resultados de variables primarias

INR dentro del rango terapéutico en el día 7 de tratamiento

Esta era la variable principal del estudio. Ocho pacientes no tenían INR en el día 7, siendo excluidos de este análisis, por lo tanto, un total de 136 pacientes fueron incluidos en el análisis de la variable principal del estudio: 72 pacientes en el grupo PGx y 64 en el grupo control. Treinta y cuatro pacientes (47,2%) tenían un valor de INR dentro del terapéutico (2 a 3) en el día 7 tras el inicio del tratamiento en el grupo PGx, en comparación con 14 (21,9%) pacientes del grupo control, ($p = 0,0023$).

Tras incluir a los ocho pacientes sin valores de INR en el día 7, asumiendo el INR más cercano a ese día, la diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos se mantuvo.

Estabilización del INR

Un total de 37 pacientes alcanzaron un INR estable según se define en el protocolo, 21 (28,4%) de los 74 pacientes del grupo PGx y 16 (22,9%) de los 70 pacientes del grupo control ($p = 0,45$). La mediana (rango) del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con acenocumarol hasta el primer día de INR estable en el grupo PGx fue de 17 (10-30) días en comparación con los 15 (10-28) días para el grupo de control ($p = 0,7929$).

Número de lecturas de INR dentro del rango terapéutico

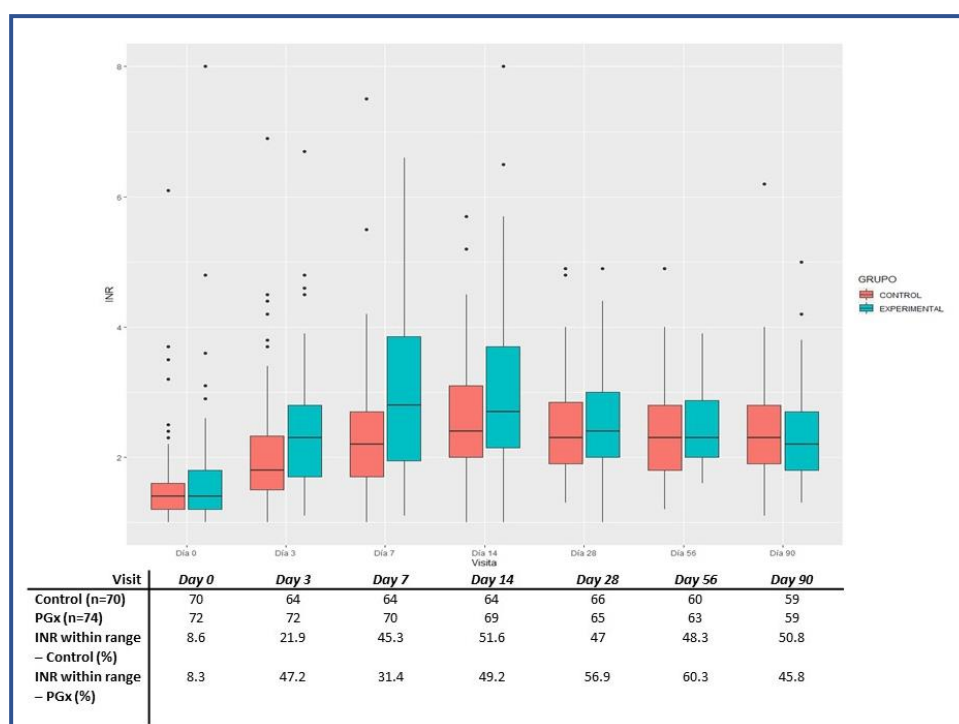
Un total de 128 pacientes alcanzaron al menos una lectura de INR dentro del rango en las primeras 6 semanas de tratamiento, 66 (89,2%) en el grupo PGx y 62 (88,6%) en el grupo control ($p = 1,000$). Durante los 3 meses de tratamiento, 135 (93,8%) pacientes tuvieron al menos una lectura del INR dentro del rango terapéutico, 70 (94,6%) en el grupo PGx y 65 (92,9%) en el grupo control ($p = 0,7402$).

Resultados de variables secundarias

Los resultados de las variables secundarias no difirieron significativamente entre los dos grupos. En la evaluación global, el grupo PGx tuvo un porcentaje medio de tiempo dentro del rango terapéutico del 54,69% (32,06) en comparación con el 58,54% (31,50) del grupo control ($p = 0,4683$).

La mayor parte de los pacientes tuvo al menos 1 visita extra no programada (aquellas visitas adicionales a las 8 establecidas en el estudio), 55 (74,3%) en el grupo de PGx y 56 (80%) en el grupo de control.

El porcentaje de pacientes con INR dentro del rango terapéutico por visita se muestra en la Fig. 5



*Outlayers.

Figura 5. Porcentaje de pacientes con INR dentro del rango terapéutico por visita programada.

Resultados de seguridad

La incidencia de acontecimientos adversos no difirió significativamente entre los dos grupos. Hubo dos eventos tromboembólicos, un TEP en el grupo control y una TVP en el grupo PGx. Hubo 6 eventos hemorrágicos en el grupo PGx y 11 en el grupo de control. No hubo diferencias en el número de pacientes con al menos un valor de INR por debajo de 1,5; sin embargo, un mayor número de pacientes del grupo PGx tuvo al menos una lectura de INR superior a 4 ($p = 0,06$) (Tabla 20).

Tabla 21. Análisis de seguridad

EA	Grupo PGx n (%) (n = 74)	Grupo Control n (%) (n = 73)	Total n (%) (n = 147)	Valor p
Pacientes con al menos 1 EA	10 (13,5)	14 (19,2)	24 (16,3)	0,35
Eventos hemorrágicos	6 (8,1)	11 (15,1)	17 (11,6)	0,18
Eventos tromboembólicos	1 (1,4)	1 (1,4)	2 (1,4)	0,99
Pacientes con al menos 1 INR <1,5	45 (60,8)	50 (68,5)	95 (64,6)	0,18
Pacientes con al menos 1 INR >4	31 (41,9)	19 (26)	50 (34)	0,06

Abreviaturas: EA, evento adverso; PGx, algoritmo farmacogenético.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El avance de la tecnología en el área de la biomedicina, tal como la secuenciación del ADN, la proteómica, metabolómica, pruebas de imagen, etc., ha revelado que existe una gran variabilidad interindividual con respecto a la fisiopatogenia de las enfermedades. Por otro lado, estos avances tecnológicos han permitido que se logre controlar mejor la variabilidad en la respuesta terapéutica. Sin embargo, el hecho de tener al alcance tanta información hace que se planteen dudas acerca del grado en que esta variabilidad interindividual debería influir en las decisiones sobre el tratamiento óptimo, la monitorización o la actitud ante cierta enfermedad para un individuo dado. En la actualidad se sugiere que las estrategias para tratar a un individuo con una enfermedad, y posiblemente para controlar o prevenir esa enfermedad, deba adaptarse o personalizarse al perfil bioquímico, fisiológico, de exposición ambiental y de comportamiento único de ese individuo.

Se prevé que el conocimiento del genoma humano continuará aportando mayor volumen y calidad de información, lo cual permitirá el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y vías relacionadas con una multitud de enfermedades, proporcionando las bases para perfeccionar las variables predictoras tanto de enfermedades como de respuesta a los fármacos.

Se han publicado múltiples ensayos clínicos controlados comprobando la utilidad clínica de los pares gen-fármaco para la optimización en la dosificación (63, 64, 81) o la selección de fármacos. Uno de los obstáculos que se plantea con el uso de la farmacogenética está relacionado con el desarrollo de guías clínicas que ayuden a dirigir la aplicación clínica de los resultados de las pruebas. Se trata de una limitación que se ha ido superando en los últimos años gracias a la aparición de grupos dedicados a la publicación de guías clínicas, muchas de las cuales ofrecen recomendaciones de acciones a tomar.

Para que las variables de interés puedan ser incluidas en las guías clínicas, deben pasar previamente por una serie de estudios determinantes y comprobar su utilidad clínica. La warfarina y el acenocumarol son buenos ejemplos de desarrollo farmacogenético, que a pesar de demostrarse su utilidad, se enfrentan con una serie de barreras para su validación y posterior implementación en la práctica clínica. Estos dos fármacos presentan un estrecho margen terapéutico y su alta variabilidad interindividual en la dosis requerida para alcanzar el INR dentro de rango terapéutico, con lo cual sería de alta utilidad poder determinar aquellas variables que influyan en esta variabilidad y poder controlarla. Para la warfarina, hay guías clínicas publicadas por los diferentes grupos (CPIC, DPWG, CPNDS) con recomendaciones de

genotipar al paciente y utilizar algoritmos farmacogenéticos validados para el cálculo de la dosis. Mientras que la única guía del acenocumarol la ha publicado el DPWG. Esta guía recomienda ajustar la dosis en pacientes con la variante VKORC1 – 1639 (rs9923231) homocigoto mutado (AA) a recibir el 50% de la dosis inicial estándar y un control más estrecho del INR. Mientras que pacientes con el genotipo VKORC1 -1639 AG sugieren que no es necesario tomar ninguna medida adicional (17, 18).

En los últimos años se han publicado numerosos algoritmos farmacogenéticos en un intento de mejorar la individualización de la dosis de warfarina y acenocumarol. Estos algoritmos pueden explicar entre el 40% y el 60% de la variabilidad en la dosificación del fármaco, pero tienen ciertas diferencias relevantes, como la etnia de los pacientes incluidos, podría ser preferible utilizar algoritmos específicos para cada grupo étnico para lograr una mejor predicción de la dosis de acenocumarol. Es conocido que los factores genéticos difieren entre las etnias, haciendo que la variabilidad explicada por los polimorfismos sea diferente, con lo cual es difícil pensar que un algoritmo desarrollado en pacientes de una etnia específica funcione con similar rendimiento en otra población. Este es uno de los motivos por el que en la literatura podemos encontrar algoritmos de dosificación de acenocumarol para poblaciones distintas (por ejemplo: Sur de India, Norte de India, caucásicos europeos, chilenos, etc) (56-58,60,61,82). La inclusión de variantes del CYP2C9 y VKORC1 es una constante entre los distintos algoritmos, son los que han demostrado tener mayor influencia en la variabilidad de la dosis de acenocumarol, pero otros genes como por ejemplo el CYP4F2, el APOE, el GGCX lo están en menor frecuencia.

La patología podría influir también en la dosis estable de acenocumarol, debido a diferencias por ejemplo en la edad de aparición de las enfermedades, o posibles diferencias a nivel metabólico o enzimático que pudiera influir en la variabilidad de la dosis, sin mencionar la medicación concomitante que pudiera estar recibiendo los pacientes de un grupo y otro, aunque este último es un factor que suele estar controlado, hace pensar si los algoritmos deberían ser desarrollados en pacientes con una patología específica dirigidos a ser utilizados únicamente en pacientes con esa misma patología para obtener un mayor rendimiento.,

De esta forma, el algoritmo farmacogenético desarrollado por nuestro grupo (58), fue desarrollado en pacientes con ETEV, para posteriormente ser utilizado en pacientes con ETEV en el ensayo clínico presentado en esta tesis.

A pesar de la comercialización de los nuevos anticoagulantes orales (ACOD) cuyo mecanismo de acción es la inhibición directa de la trombina y del factor X activado; los anticoagulantes orales inhibidores de la vitamina K como la warfarina, el acenocumarol y el fenprocumón siguen teniendo una alta tasa de prescripción para el tratamiento de la ETEV, la FA y el RV. En España para el año 2019 se estimaba que el uso de los ACOD representaba el 40% mientras que los AVK un 59%, si bien es cierto que en otros países de Europa la relación es justo la contraria (33).

La elevada variabilidad interindividual en la dosificación de los AVKs se ha atribuido a diversos factores clínicos, demográficos y a variaciones genéticas. Esta elevada variabilidad afecta notablemente el tiempo dentro del INR objetivo y a los resultados clínicos. Jones et al, demostraron que un aumento del 10% en el tiempo fuera de rango se asociaba a un riesgo de mortalidad un 29% mayor, a un aumento del 10% en el riesgo de ictus isquémico y un aumento del 12% en todos los acontecimientos tromboembólicos (83). Para los pacientes con ETEV, el riesgo de progresión, recurrencia y muerte debido a TEP es mayor en las primeras semanas después del diagnóstico. A pesar de los modernos métodos de diagnóstico y tratamiento, el TEP sigue teniendo una alta tasa de mortalidad durante los primeros 3 meses, lo que probablemente se deba a la recurrencia del trombo. La frecuencia de desarrollo de TEP podría reducirse si se utilizara una anticoagulación más adecuada desde el inicio del tratamiento (84).

En los pacientes con FA, la prevención del ictus y el tromboembolismo son los principales objetivos terapéuticos. En estos pacientes, la tasa de eventos tromboembólicos aumenta del 2,5% a más del 12% al año si no está correctamente anticoagulado (85). La tasa de hemorragia grave registrada en pacientes con FA en tratamiento con warfarina oscila entre 1,3 y 7,2 por cada 100 personas/año. Los pacientes con FA tienden a ser mayores, tienen comorbilidades asociadas y tienen un mayor número de medicamentos concomitantes (85). Los primeros 90 días de iniciado el tratamiento anticoagulante se asocia a un riesgo 3 veces mayor de hemorragia mayor (86). Estos datos se corresponden con los de nuestro estudio, en el que los pacientes con FA tenían la dosis media más baja de acenocumarol, lo que podría aumentar la probabilidad de que algunos pacientes erróneamente reciban una dosis mayor de acenocumarol al inicio del tratamiento. En la práctica clínica, la estimación de los riesgos de hemorragia como del riesgo de ictus se recomienda para orientar las decisiones sobre el tratamiento tromboprolifático (87,88).

Esta memoria está compuesta de 3 estudios publicados que representan los diferentes pasos para el desarrollo global de un biomarcador, en este caso de la farmacogenética del

acenocumarol: el primer estudio y artículo publicado es el desarrollo de un nuevo algoritmo de dosificación de acenocumarol en una cohorte mayor de pacientes portadores de distintas enfermedades que requería anticoagulación con acenocumarol. El segundo artículo se trata de la evaluación de la influencia de otros dos genes (POR*28 y POR rs2868177) en la dosis estable de acenocumarol. Y por último la realización de un ensayo clínico para evaluar la eficacia y seguridad de incluir el uso de un algoritmo farmacogenético en la dosificación inicial de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, este estudio utilizó el primer algoritmo desarrollado por nuestro grupo de estudio. Así mismo, se incluye un metaanálisis corporativo internacional de datos individuales, en el cual se evaluó la influencia de la inclusión del polimorfismo CYP4F2*3 en la dosis estable de los cumarínicos.

Desarrollo de un algoritmo para las diferentes situaciones clínicas tratadas con acenocumarol.

Los resultados del primer estudio confirman que variables demográficas, clínicas básicas y marcadores farmacogenéticos permiten explicar más del 50% de la variabilidad interindividual en la dosis estable de acenocumarol en las diferentes situaciones clínicas en las que se utiliza para prevenir eventos tromboembólicos: enfermedad tromboembólica venosa, fibrilación auricular y reemplazo valvular.

El algoritmo previamente diseñado y validado por nuestro grupo fue desarrollado para una cohorte de pacientes con tromboembolismo venoso (58). Dado que estos pacientes son típicamente más jóvenes, tienen menos comorbilidad y tienen menos medicamentos concomitantes, creemos que este algoritmo podría tener un menor rendimiento para ser aplicado a pacientes con otras patologías que requieran anticoagulación con acenocumarol. Por ello se decidió elaborar un algoritmo incluyendo pacientes con fibrilación auricular con y sin reemplazo valvular en un estudio multicéntrico.

Los factores más importantes para la predicción de la dosis son los mismos ya confirmados por otros grupos, principalmente polimorfismos del VKORC1 y CYP2C9 mientras que el CYP4F2 tiene menos influencia. En cuanto a las variables clínicas, la edad y el peso fueron los factores clínicos más importantes para la predicción de la dosis. Otras variables que encontramos significativas, como los medicamentos concomitantes y el INR objetivo, no se incluyen sistemáticamente en los algoritmos publicados (56-61).

Los 2 algoritmos publicados por nuestro grupo presentan diferencias en cuanto a las variables incluidas. Por un lado, incluimos la variable INR objetivo en este nuevo algoritmo,

justificado por los diferentes INR objetivo para los distintos diagnósticos. Encontramos que el INR objetivo tenía una influencia modesta pero significativa. Por otra parte, la contribución de la APOE a la variabilidad total no se confirmó en este estudio porque no fue significativa ($p = 0,521$; $R^2 = 0,1\%$), y por tanto no se incluyó en el algoritmo. La inclusión en el algoritmo de la toma de determinados fármacos, como los inductores enzimáticos y la amiodarona, también se justifica por los datos de la literatura sobre su influencia en la dosis de los AVKs, y como hemos visto en el modelo, su influencia es significativa (beta de 0,070 y -0,337 respectivamente). La ingesta de amiodarona fue una de las variables incluidas en el algoritmo publicado por el grupo EU-PACT, con un resultado similar (beta de -0,377).

Al considerar toda la cohorte, este algoritmo explicó el 55% de la variabilidad interindividual de la dosis de acenocumarol que proporciona un INR estable. Las variables clínicas explicaron el 15,1% de esta variabilidad, mientras que la inclusión de las variables genéticas aumentó en gran medida el potencial predictivo de la dosis requerida por cada paciente. Los algoritmos publicados para otras poblaciones no serían totalmente comparables con los resultados de este algoritmo. Hay variaciones en la frecuencia de los polimorfismos entre los distintos grupos étnicos; algunos genes tienen más impacto en un grupo étnico que en otro. Así, en el estudio realizado en la población del norte de India (60), los polimorfismos VKORC1 y CYP4F2 fueron las principales variables genéticas mientras que en el algoritmo desarrollado para India del sur y los de la población europea, el VKORC1 y el CYP2C9 son los factores genéticos que más contribuyen al rendimiento de estos algoritmos. Además, nuestro algoritmo difiere de los publicados para la población india (60,61); los autores de esos algoritmos incluyeron polimorfismos del gen GGCX (rs11676382), que nosotros no incluimos.

Cuando se evaluó el rendimiento predictivo del algoritmo farmacogenético por enfermedad, la mejor predicción fue para el grupo de FA (R^2 del 57,4%), que fue similar a la R^2 encontrada para el grupo de RV. Para los pacientes con ETEV, la variabilidad explicada por el algoritmo fue algo menor ($R^2 = 51,5\%$), sin embargo, el MAE y el %MAE fueron similares en todos los grupos, lo que confirma que el algoritmo funcionó de forma similar en todos los grupos.

No es de extrañar que, al utilizar las dosis iniciales estándar o las dosis basadas en variables clínicas, la mayoría de los pacientes incorrectamente dosificados fueran los que necesitaban dosis bajas o altas de acenocumarol. Estos son los pacientes de los que cabe esperar que se beneficien más del algoritmo farmacogenético debido a que la estabilización del INR se hace más compleja, además de requerir mayor tiempo para alcanzarla. En este estudio, el

porcentaje de pacientes para los que el algoritmo farmacogenético habría mejorado la dosificación de acenocumarol en comparación con un algoritmo clínico habría sido de aproximadamente el 12,7% (87 pacientes de un total de 685). La mayoría eran pacientes que necesitaban dosis bajas (27 pacientes) y dosis notablemente más altas (45 pacientes). Los primeros se habrían sobredosificado durante varias semanas (hasta que los ajustes clínicos de la dosis alcanzaran un INR estable) con el riesgo de sufrir una hemorragia, mientras que los segundos podrían haber recibido una dosis insuficiente con el riesgo de presentar una trombosis.

Este estudio tiene una serie de limitaciones. No se incluyeron una serie de parámetros que también se han relacionado con los cambios en las dosis estables de acenocumarol, como el hábito tabáquico, otros medicamentos concomitantes y la ingesta de vitamina K en la dieta. Todos ellos son factores importantes a tener en cuenta a la hora de establecer una dosis estable de acenocumarol.

Impacto de polimorfismos de POR y CYP4F2 en la dosis estable de acenocumarol y en el algoritmo farmacogenético desarrollado.

A pesar de que los algoritmos desarrollados por nuestro grupo tienen un adecuado poder de predicción de la dosis estable de acenocumarol, los polimorfismos del POR se consideraron candidatos potenciales para explicar una parte adicional de la variabilidad encontrada hasta la fecha en la respuesta al acenocumarol y a la warfarina (un máximo del 50-60%). El efecto real de la actividad del POR sobre el acenocumarol es aún desconocido. El POR humano es un gen muy polimórfico, por lo que su relación con el metabolismo del fármaco no está del todo clara. La mayoría de los estudios sugieren que la influencia de los polimorfismos del POR en la actividad de la isoenzima CYP450 depende del sustrato y de la isoforma del CYP450 implicada; para algunos fármacos se observa un aumento de la actividad, mientras que en otros se produce una reducción.

De acuerdo con los conocimientos previos sobre el mecanismo de acción del POR comentados en la introducción, nuestra hipótesis era que podría haber una interacción entre el CYP2C9 y las variantes del POR evaluadas. Este fue el primer estudio que evaluó su asociación con la dosis de acenocumarol.

En este estudio, además del cálculo de la R², utilizamos el criterio de información de Akaike (AIC) para evaluar la contribución de POR*28 y POR rs2868177 al rendimiento del algoritmo farmacogenético en la predicción de la dosis estable de acenocumarol en una población mixta. El modelo con el valor AIC más bajo fue el que incluía los polimorfismos de

POR*28, y esta variable siguió siendo estadísticamente significativa dentro del modelo. Sin embargo, su inclusión en el algoritmo aumentó el valor de la R² sólo marginalmente en un 0,5%. Creemos, por tanto, que la contribución de POR*28 a la variabilidad de la dosis estable de acenocumarol es muy baja y no mejora sustancialmente el rendimiento global de nuestro algoritmo farmacogenético.

Tampoco encontramos ninguna evidencia de que el POR rs2868177 se asocie con la dosis estable de acenocumarol ni mejoró el rendimiento de nuestro algoritmo farmacogenético.

Nuestro estudio tenía algunas limitaciones. En primer lugar, el bajo número de pacientes con actividad reducida del CYP2C9 limita limitó la potencia para demostrar su interacción con el genotipo POR. En segundo lugar, aunque evaluamos las dos variantes más frecuentes del POR descritas en la literatura como las más influyentes en el metabolismo del fármaco, no podemos descartar la posible influencia de otras variantes del POR en la dosificación del acenocumarol. También sería interesante poder evaluar la influencia global de las variantes de POR (incluyendo otros SNPs del gen POR) en una cohorte mayor de pacientes.

A pesar de tener un menor efecto, el CYP4F2 es considerado actualmente el tercer gen más influyente en la dosis de mantenimiento de los fármacos cumarínicos. Los estudios anteriores ya mostraban una posible mejora en la predicción al igual que los algoritmos desarrollados por nuestro grupo. Para tener resultados más concluyentes, se realizó un metaanálisis en pacientes individuales para evaluar el tamaño real del efecto del polimorfismo CYP4F2*3. Se identificó diferencias entre los distintos fármacos cumarínicos: los pacientes que tomaban acenocumarol y eran portadores del alelo T necesitaban una dosis mayor del fármaco en comparación con los pacientes que tomaban warfarina y eran portadores del mismo polimorfismo. Además, el metaanálisis puso en evidencia diferencias entre etnias, siendo la población blanca y asiática la que se vio más afectada a las necesidades de dosis de estos fármacos.

Efectividad de un algoritmo farmacogenético en la dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica.

A pesar de la contribución de los algoritmos farmacogenéticos para explicar la variabilidad en la dosificación de los fármacos cumarínicos, siguen existiendo dudas sobre su aplicabilidad en la práctica clínica habitual. Hasta la fecha se han publicado varios ensayos clínicos y metaanálisis sobre la warfarina y acenocumarol, pero con resultados no concluyentes (89-94). Es importante resaltar ciertas diferencias entre los distintos ensayos clínicos tanto para

la warfarina como para el acenocumarol. La rama control, en algunos estudios incluyen algoritmos clínicos y otros utilizan la atención clínica estándar, que puede diferir significativamente entre los países. La duración del seguimiento también varía entre los estudios, lo que complica la comparación de los diferentes algoritmos. Otra diferencia es la variable primaria de evaluación, en muchos casos utilizan el porcentaje de tiempo dentro del rango terapéutico, en otros casos, como en nuestro ensayo clínico, utilizamos el tiempo hasta obtener INR estable.

En el caso del acenocumarol, solo hay disponibles otros dos ensayos clínicos, ambos en poblaciones mixtas, con FA y ETEV y con resultados que tampoco son concluyentes. Verhoef et al, compararon un algoritmo de dosificación guiado por el genotipo frente a un algoritmo de dosificación basado únicamente en factores clínicos. Los autores reclutaron a pacientes con FA (83%) o ETEV (17%) que iniciaban tratamiento con acenocumarol. Sus resultados mostraron que el uso de la dosificación guiada por el genotipo no mejoró el tiempo dentro del rango terapéutico del INR durante las 12 semanas posteriores al inicio del tratamiento (64). El otro ensayo clínico, realizado por Cerezo-Manchado et al, en pacientes con FA, mostró que el porcentaje de pacientes que alcanzaban una dosis estable en 90 días era mayor en el brazo farmacogenético (39% frente al 25%; $p = 0,038$). Los autores también observaron que el grupo farmacogenético tenía un mayor porcentaje de INR terapéuticos que el grupo de atención estándar (50% frente a 45%; $p = 0,046$) (65).

El ensayo clínico realizado por nuestro grupo comparó un algoritmo compuesto por información demográfica, clínica y genética frente a la dosificación según práctica clínica habitual, con el fin de determinar la dosis inicial de acenocumarol necesaria para conseguir un INR entre 2 y 3 en pacientes con TVP y/o TEP recién diagnosticados.

Nuestros resultados muestran que, en el séptimo día tras el inicio del tratamiento, el 47% de los pacientes del brazo del algoritmo farmacogenético estaba dentro del rango terapéutico, en comparación con el 22% en el brazo de control clínico. Al diseñar el ensayo clínico, seleccionamos esta variable como criterio de valoración principal porque un retraso en alcanzar el INR adecuado en la enfermedad tromboembólica está relacionado con resultados adversos (95-97). Por lo tanto, consideramos que los resultados confirman la utilidad de este algoritmo farmacogenético para lograr un INR terapéutico poco después de iniciar el tratamiento con acenocumarol en esta población, Verhoef et al, encontraron resultados similares, mostrando que el tiempo dentro del rango terapéutico durante las primeras 4 semanas tras el inicio del tratamiento fue mayor en el grupo guiado por el genotipo (52,8% frente al 47,5%), Sin embargo,

tal como los autores comentan en su artículo, su análisis no fue corregido para las pruebas múltiples, y no se descarta que esta diferencia fuera un hallazgo casual (64).

Lograr un INR dentro del rango objetivo lo antes posible tras el diagnóstico de ETEV es crucial para esta población, y nuestros resultados muestran que un algoritmo farmacogenético puede ayudar a lograr este objetivo, con un número necesario para tratar (NNT) de 4 para obtener un INR dentro del rango terapéutico durante la primera semana. Sin embargo, después de los primeros días, los cambios se deben principalmente a los resultados anteriores del INR y a otros factores que influyen en la variabilidad del INR, además de la farmacogenética. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los controles posteriores del INR, lo que podría estar relacionado con los ajustes realizados en ambos grupos mediante las determinaciones de INR habituales, reduciendo así la influencia positiva de la predicción inicial alcanzada mediante el algoritmo farmacogenético. Además de la ampliamente conocida práctica clínica de ajustar la dosis de acenocumarol, en la que las primeras lecturas de INR se ven mejoradas en las siguientes determinaciones del INR. Este fenómeno ya se observó en un ensayo publicado anteriormente (64).

De acuerdo a los datos del ensayo, el genotipado sería especialmente relevante para aquellos pacientes que requieren dosis extremas, dado que los ajustes de dosis a través de la monitorización del INR se realizan de forma bastante lenta, con cambios progresivos hasta alcanzar la dosis estable requerida. Según nuestros datos, el 51% de los pacientes necesitaron >21 mg/semana o 11 mg/semana.

Hay que tener en cuenta algunos aspectos importantes a la hora de interpretar estos resultados:

1. Los pacientes objetivo de los otros ensayos clínicos sobre acenocumarol incluían principalmente a pacientes con FA, mientras que los de nuestro ensayo clínico difieren, además de en el diagnóstico, en sus características demográficas: son más jóvenes (66 frente a 72,4 años) y requieren dosis semanales de acenocumarol más altas (15 frente a 13,5) que los pacientes con FA.
2. El objetivo de maximizar el tiempo dentro del rango terapéutico es importante no sólo para los pacientes con ETEV, sino también para los que padecen otras enfermedades, como afirman Gage et al, quienes, en el Genetic Informatics Trial, demostraron la eficacia de un algoritmo farmacogenético en pacientes con artroplastia electiva de rodilla o cadera (98).

Dadas las similitudes de los diferentes algoritmos desarrollados por nuestro grupo en cuanto a la variabilidad explicada por los factores clínicos y marcadores genéticos, podemos asumir que este ensayo clínico supone una positiva prueba de concepto para la aplicación de la farmacogenética en esta área.

Las principales limitaciones de este ensayo clínico fueron las siguientes: (1) el uso de una variable intermedia debido a que el objetivo de los criterios de valoración clínica requeriría un número muy elevado de pacientes, (2) no se pudo alcanzar el tamaño muestral calculado, sin embargo, se encontró una diferencia significativa en la variable principal a pesar de esta limitación. No obstante, no se sabe con certeza cuál habría sido el resultado de algunas de las variables evaluadas que actualmente tienen un valor de significación estadística límite, como la evaluación de la seguridad, en la que posiblemente un mayor número de pacientes del grupo de dosificación por el algoritmo farmacogenético habría tenido un valor de INR superior a 4. Además, el diseño no cegado probablemente permitió un seguimiento más estrecho y ajustes de la dosis de acenocumarol después del día 7 pero contribuyó a difuminar las diferencias entre grupos en el control del INR.

En definitiva, esta tesis doctoral representa un claro ejemplo de las fases de desarrollo y validación de los biomarcadores. Empezando por la creación de modelos de predicción utilizando variables predictoras, tras lo cual, se pasó a la fase de validación clínica a través de la ejecución de un ensayo clínico aleatorizado para aportar el mayor nivel de evidencia.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos de los tres genes estudiados (CYP2C9, VKORC1 y CYP4F2) añadidos a las variables demográficas-clínicas de edad, peso, uso de fármacos inductores enzimáticos, medicación concomitante con amiodarona y valor del INR objetivo, contribuyen a predecir la dosis de acenocumarol para obtener un INR estable dentro de rango terapéutico en una cohorte de pacientes con múltiples patologías.
 - 1.1. El algoritmo farmacogenético desarrollado en pacientes con diversas patologías explica un 52.8% de la variabilidad en los requerimientos de dosis de acenocumarol.
 - 1.2. El POR*28 heterocigoto tuvo una asociación estadísticamente significativa con la dosis estable de acenocumarol, sin embargo, su contribución en la capacidad predictiva del algoritmo es baja, por lo que no consideramos su inclusión en el algoritmo farmacogenético.
 - 1.3. No encontramos asociación entre las variantes del POR rs2868177 y la dosis estable de acenocumarol.
 - 1.4. El polimorfismo del CYP4F2*3 (rs2108622) influye en los requerimientos de dosis de acenocumarol, incrementando la dosis semanal en un 9%.
2. La realización del ensayo clínico permitió validar el algoritmo farmacogenético desarrollado en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, habiéndose mostrado efectivo para obtener más precozmente un INR dentro del rango terapéutico.
3. El uso de un algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa no reportó diferencias estadísticamente significativas en términos de acontecimientos clínicos adversos relevantes comparado con la dosificación según práctica clínica habitual.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EMA/CHMP/268544/2016. Guideline on good pharmacogenomic practice. London, 28 April 2016
2. Salari K, Watkins H, Ashley EA. Personalized medicine: hope or hype? *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(13):1564-70. doi: 10.1093/eurheartj/ehs112. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22659199; PMCID: PMC3388016
3. Sweeney GD. Variability in the human drug response. *Thromb Res Suppl*. 1983;4:3-15. doi: 10.1016/0049-3848(83)90353-5.
4. Barranco Garduño L, Neri Salvador J, León Molina H, Carrasco Portugal M, Flores Murrieta F, Patiño Camacho S. La farmacocinética poblacional y su importancia en la terapéutica. *Med Int Mex* 2011;27(4):370-377
5. Schwartz JB. The current state of knowledge on age, sex, and their interactions on clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Jul;82(1):87-96. doi: 10.1038/sj.clpt.6100226. Epub 2007 May 9.
6. Hanley MJ, Abernethy DR, Greenblatt DJ. Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(2):71-87. doi: 10.2165/11318100-000000000-00000.
7. Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Dec;64(12):1147-61. doi: 10.1007/s00228-008-0553-z.
8. Gibson TP. Renal disease and drug metabolism: an overview. *Am J Kidney Dis*. 1986 Jul;8(1):7-17. doi: 10.1016/s0272-6386(86)80148-2.
9. Regårdh CG. Factors contributing to variability in drug pharmacokinetics. IV. Renal excretion. *J Clin Hosp Pharm*. 1985 Dec;10(4):337-49. doi: 10.1111/j.1365-2710.1985.tb00932.x.
10. Kozyra M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes, and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. *Genet Med*. 2017 Jan;19(1):20-29. doi: 10.1038/gim.2016.33.
11. Lauschke VM, Milani L, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomic Biomarkers for Improved Drug Therapy-Recent Progress and Future Developments. *AAPS J*. 2017 Nov 27;20(1):4. doi: 10.1208/s12248-017-0161-x.

12. Ramaswami Ramya, Bayer Ronald, Galea Sandro. Precision Medicine from a Public Health Perspective. *Annual Review of Public Health* 2018. 39:153-68
13. Alwi ZB. The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *Malays J Med Sci*. 2005 Jul;12(2):4-12.
14. Pinho JR, Sitnik R, Manguiera CL. Personalized medicine and the clinical laboratory. *Einstein (Sao Paulo)*. 2014 Sep;12(3):366-73. doi: 10.1590/s1679-45082014rw2859.
15. EMEA/CHMP/ICH/437986/2006. ICH Topic E15 Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. November 2007.
16. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65. doi: 10.1056/NEJMoa0804385.
17. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2021 Sep;110(3):563-572. doi: 10.1002/cpt.2350.
18. The Royal Dutch Pharmacists Association KNMP <https://www.knmp.nl/patientenzorg/medicatiebewaking/farmacogenetica/pharmacogenetics-1/pharmacogenetics>
19. Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Mar;89(3):464-7. doi: 10.1038/clpt.2010.279.
20. Abdullah-Koolmees H, van Keulen AM, Nijenhuis M, Deneer VHM. Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPx Guidelines. *Front Pharmacol*. 2021 Jan 25;11:595219. doi: 10.3389/fphar.2020.595219.
21. Tan-Koi WC, Leow PC, Teo YY. Applications of pharmacogenomics in regulatory science: a product life cycle review. *Pharmacogenomics J*. 2018 May 22;18(3):359-366. doi: 10.1038/tpj.2017.47.
22. Pierna Álvarez M, Marcos-Vadillo E, García-Berrocal B, Isidoro-García M. Pharmacogenomic: The personalized medicine. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2019; 12(3):147-154.
23. Brian D. Modena, Ali Doroudchi, Parth Patel, Varshini Sathish, Chapter 18 - Leveraging genomics to uncover the genetic, environmental and age-related factors leading to asthma, Editor(s): Geoffrey S. Ginsburg, Huntington F. Willard, Ephraim L. Tsalik, Christopher W.

- Woods, *Genomic and Precision Medicine (Third Edition)*, Academic Press, 2019, Pages 331-381,
24. Lee MT, Klein TE. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities. *J Hum Genet.* 2013 Jun;58(6):334-8. doi: 10.1038/jhg.2013.40. Epub 2013 May 9.
 25. van Gorp RH, Schurgers LJ. New Insights into the Pros and Cons of the Clinical Use of Vitamin K Antagonists (VKAs) Versus Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Nutrients.* 2015 Nov 17;7(11):9538-57. doi: 10.3390/nu7115479.
 26. Ficha técnica acenocumarol, CIMA, 2019
 27. Thijssen HH, Drittij MJ, Vervoort LM, de Vries-Hanje JC. Altered pharmacokinetics of R- and S-acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9*3. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Sep;70(3):292-8. doi: 10.1067/mcp.2001.117936.
 28. Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RM, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Apr;77(4):626-41. doi: 10.1111/bcp.12220.
 29. Pirmohamed M. Personalized pharmacogenomics: predicting efficacy and adverse drug reactions. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014;15:349-70. doi: 10.1146/annurev-genom-090413-025419. Epub 2014 May 29.
 30. Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY. Novel oral anticoagulants. *Int J Clin Pract.* 2009 Apr;63(4):630-41. doi: 10.1111/j.1742-1241.2009.02011.x.
 31. Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag.* 2015 Jun 24;11:967-77. doi: 10.2147/TCRM.S84210.
 32. Pollack CV Jr, Reilly PA, van Ryn J, Eikelboom JW, Glund S, Bernstein RA, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal - Full Cohort Analysis. *N Engl J Med.* 2017 Aug 3;377(5):431-441. doi: 10.1056/NEJMoa1707278. 2017 Jul 11.
 33. J.L. Llisterri Caroa, S. Cinza-Sanjurjo, J. Polo Garcia y M.A. Prieto Díaz. Utilización de los anticoagulantes orales de acción directa en Atención Primaria de España. Posicionamiento de SEMERGEN ante la situación actual, 2019.
 34. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2329-33. doi: 10.1182/blood-2005-03-1108.

35. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005 Jun 2;352(22):2285-93. doi: 10.1056/NEJMoa044503.
36. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4106-12. doi: 10.1182/blood-2007-11-122010.
37. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):753-64. doi: 10.1056/NEJMoa0809329. Erratum in: *N Engl J Med*. 2009 Oct 15;361(16):1613. Dosage error in article text.
38. Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, O Kane DJ, Xia F, Verbrugge RR, et al. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 22;55(25):2804-12. doi: 10.1016/j.jacc.2010.03.009.
39. Dávila-Fajardo CL, Díaz-Villamarín X, Antúnez-Rodríguez A, Fernández-Gómez AE, García-Navas P, Martínez-González LJ, et al. Pharmacogenetics in the Treatment of Cardiovascular Diseases and Its Current Progress Regarding Implementation in the Clinical Routine. *Genes (Basel)*. 2019 Apr 1;10(4):261. doi: 10.3390/genes10040261.
40. Montes R, Ruiz de Gaona E, Martínez-González MA, Alberca I, Hermida J. The c.-1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients. *Br J Haematol*. 2006 Apr;133(2):183-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06007.x.
41. Militaru FC, Vesa SC, Pop TR, Buzoianu AD. Pharmacogenetics aspects of oral anticoagulants therapy. *J Med Life*. 2015 Apr-Jun;8(2):171-5.
42. Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost*. 2005 Oct;94(4):773-9. doi: 10.1160/TH05-04-0290.
43. Soares RA, Santos PC, Machado-Coelho GL, do Nascimento RM, Mill JG, Krieger JE, et al. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms are differently distributed in the Brazilian population according to self-declared ethnicity or genetic ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Aug;16(8):957-63. doi: 10.1089/gtmb.2012.0019.
44. Kirchheiner J, Brockmüller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Jan;77(1):1-16. doi: 10.1016/j.clpt.2004.08.009.

45. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1816-9.
46. Beinema M, Brouwers JR, Schalekamp T, Wilffert B. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thromb Haemost*. 2008 Dec;100(6):1052-7.
47. Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4977-9. doi: 10.1182/blood-2008-09-176222.
48. Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. *Thromb Res*. 2014 Sep;134(3):604-9. doi: 10.1016/j.thromres.2014.06.022.
49. Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Oct;20(10):611-8. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833e0cb5.
50. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1281-91. doi: 10.2217/pgs.11.77.
51. Elens L, Nieuweboer AJ, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, et al. Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Mar;23(3):148-55. doi: 10.1097/FPC.0b013e32835dc113.
52. Ragia G, Kolovou V, Tavridou A, Elens L, Tselepis AD, Elisaf M, et al. Lack of association of the p450 oxidoreductase *28 single nucleotide polymorphism with the lipid-lowering effect of statins in hypercholesterolemic patients. *Mol Diagn Ther*. 2014 Jun;18(3):323-31. doi: 10.1007/s40291-013-0082-z.
53. Subramanian M, Agrawal V, Sandee D, Tam HK, Miller WL, Tracy TS. Effect of P450 oxidoreductase variants on the metabolism of model substrates mediated by CYP2C9.1, CYP2C9.2, and CYP2C9.3. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Aug;22(8):590-7. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283544062.
54. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin

- maintenance dose. *Drug Metab Dispos.* 2011 Aug;39(8):1433-9. doi: 10.1124/dmd.111.038836.
55. Tan SL, Li Z, Zhang W, Song GB, Liu LM, Peng J, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase genetic polymorphisms A503V and rs2868177 do not significantly affect warfarin stable dosage in Han-Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013 Oct;69(10):1769-75. doi: 10.1007/s00228-013-1544-2.
56. Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb Haemost.* 2013 Jan;109(1):146-53. doi: 10.1160/TH12-08-0631.
57. van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJ, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J.* 2011 Aug;32(15):1909-17. doi: 10.1093/eurheartj/ehr116. Epub 2011 Jun 2. Erratum in: *Eur Heart J.* 2013 Jun;34(24):1854.
58. Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One.* 2012;7(7):e41360. doi: 10.1371/journal.pone.0041360.
59. Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernández MA. Prediction of stable acenocoumarol dose by a pharmacogenetic algorithm. *Pharmacogenet Genomics.* 2014 Oct;24(10):501-13. doi: 10.1097/FPC.0000000000000082.
60. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS One.* 2012;7(5):e37844. doi: 10.1371/journal.pone.0037844. Epub 2012 May 22.
61. Krishna Kumar D, Shewade DG, Lorient MA, Beaune P, Sai Chandran BV, Balachander J, et al. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015 Feb;71(2):173-81. doi: 10.1007/s00228-014-1791-x.
62. Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med.* 2013 Dec 12;369(24):2283-93. doi: 10.1056/NEJMoa1310669. Epub 2013 Nov 19.

63. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med*. 2013 Dec 12;369(24):2294-303. doi: 10.1056/NEJMoa1311386.
64. Verhoef TI, Ragia G, de Boer A, Barallon R, Kolovou G, Kolovou V, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N Engl J Med*. 2013 Dec 12;369(24):2304-12. doi: 10.1056/NEJMoa1311388.
65. Cerezo-Manchado JJ, Roldán V, Corral J, Rosafalco M, Antón AI, Padilla J, Vicente V, et al. Genotype-guided therapy improves initial acenocoumarol dosing. Results from a prospective randomised study. *Thromb Haemost*. 2016 Jan;115(1):117-25. doi: 10.1160/TH14-09-0814.
66. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*. 2007 Nov 27;116(22):2563-70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737312.
67. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Mar;83(3):460-70. doi: 10.1038/sj.clpt.6100316.
68. Huang SW, Chen HS, Wang XQ, Huang L, Xu DL, Hu XJ, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Mar;19(3):226-34. doi: 10.1097/FPC.0b013e328326e0c7.
69. Burmester JK, Berg RL, Yale SH, Rottschait CM, Glurich IE, Schmelzer JR, et al. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med*. 2011 Jun;13(6):509-18. doi: 10.1097/GIM.0b013e31820ad77d.
70. Wang M, Lang X, Cui S, Fei K, Zou L, Cao J, et al. Clinical application of pharmacogenetic-based warfarin-dosing algorithm in patients of Han nationality after rheumatic valve replacement: a randomized and controlled trial. *Int J Med Sci*. 2012;9(6):472-9. doi: 10.7150/ijms.4637. Epub 2012 Aug 10.
71. Jonas DE, Evans JP, McLeod HL, Brode S, Lange LA, Young ML, et al. Impact of genotype-guided dosing on anticoagulation visits for adults starting warfarin: a randomized controlled trial. *Pharmacogenomics*. 2013 Oct;14(13):1593-603. doi: 10.2217/pgs.13.145.
72. López-Parra AM, Borobia AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Carcas AJ. A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in

- acenocoumarol metabolism. *Clin Biochem.* 2013 Jan;46(1-2):167-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.08.005.
73. Carcas AJ, Borobia AM, Velasco M, Abad-Santos F, Díaz MQ, Fernández-Capitán C, et al. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2012 Dec 13;13:239. doi: 10.1186/1745-6215-13-239.
74. Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. *Behav Genet.* 2003 Jan;33(1):67-72. doi: 10.1023/a:1021055617738.
75. Gómez-Martín A, Hernández AF, Martínez-González LJ, González-Alzaga B, Rodríguez-Barranco M, López-Flores I, et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere.* 2015 Nov;139:534-40. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.07.079. Epub 2015 Aug 27.
76. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19(6), 716–723 (1974).
77. R Core Team. A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2013).
78. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. (2015).
79. NCIB. dbSNP short genetic variations: Reference SNP (refSNP) cluster report: rs286817. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
80. Naranjo, C.A. Busto, U. Sellers, E. Sandor, P. Ruiz, I. Roberts, E.A., et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981, 30, 239–245.
81. Coenen MJ, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJ, Vermeulen SH, Wong DR, et al. Identification of Patients With Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events During Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2015 Oct;149(4):907-17.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.002.
82. Roco A, Nieto E, Suárez M, Rojo M, Bertoglia MP, Verón G, et al. A Pharmacogenetically Guided Acenocoumarol Dosing Algorithm for Chilean Patients: A Discovery Cohort Study. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 6;11:325. doi: 10.3389/fphar.2020.00325.

83. Jones M, McEwan P, Morgan CL, Peters JR, Goodfellow J, Currie CJ. Evaluation of the pattern of treatment, level of anticoagulation control, and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvar atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart*. 2005 Apr;91(4):472-7. doi: 10.1136/hrt.2004.042465.
84. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet*. 1999 Apr 24;353(9162):1386-9. doi: 10.1016/s0140-6736(98)07534-5.
85. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Borowsky LH, Henault LE, Chang Y, et al. Implications of stroke risk criteria on the anticoagulation decision in nonvalvular atrial fibrillation: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) study. *Circulation*. 2000 Jul 4;102(1):11-3. doi: 10.1161/01.cir.102.1.11.
86. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation*. 2007 May 29;115(21):2689-96. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653048.
87. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al; Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014 Nov 14;35(43):3033-69, 3069a-3069k. doi: 10.1093/eurheartj/ehu283. Epub 2014 Aug 29. Erratum in: *Eur Heart J*. 2015 Oct 14;36(39):2666. Erratum in: *Eur Heart J*. 2015 Oct 14;36(39):2642.
88. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):454S-545S. doi: 10.1378/chest.08-0658. Erratum in: *Chest*. 2008 Oct;134(4):892.
89. Tang T, Liu J, Zuo K, Cheng J, Chen L, Lu C, et al. Genotype-Guided Dosing of Coumarin Anticoagulants: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015 Jul;20(4):387-94. doi: 10.1177/1074248414565666.
90. Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Bonfanti C, Mannucci PM. Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2014 Sep;12(9):1480-7. doi: 10.1111/jth.12647.

91. Shi C, Yan W, Wang G, Wang F, Li Q, Lin N. Pharmacogenetics-Based versus Conventional Dosing of Warfarin: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2015 Dec 16;10(12):e0144511. doi: 10.1371/journal.pone.0144511.
92. Stergiopoulos K, Brown DL. Genotype-guided vs clinical dosing of warfarin and its analogues: meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Intern Med*. 2014 Aug;174(8):1330-8. doi: 10.1001/jamainternmed.2014.2368.
93. Belley-Cote EP, Hanif H, D'Aragnon F, Eikelboom JW, Anderson JL, Borgman M, et al. Genotype-guided versus standard vitamin K antagonist dosing algorithms in patients initiating anticoagulation. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2015 Oct;114(4):768-77. doi: 10.1160/TH15-01-0071.
94. Danese E, Raimondi S, Montagnana M, Tagetti A, Langae T, Borgiani P, et al. Effect of CYP4F2, VKORC1, and CYP2C9 in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals. *Clin Pharmacol Ther*. 2019 Jun;105(6):1477-1491. doi: 10.1002/cpt.1323.
95. Howard LS, Hughes RJ. NICE guideline: management of venous thromboembolic diseases and role of thrombophilia testing. *Thorax*. 2013 Apr;68(4):391-3. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-202376.
96. Oake N, Jennings A, Forster AJ, Fergusson D, Doucette S, van Walraven C. Anticoagulation intensity and outcomes among patients prescribed oral anticoagulant therapy: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2008 Jul 29;179(3):235-44. doi: 10.1503/cmaj.080171.
97. Yetkin U, Karabay O, Onol H. Effects of oral anticoagulation with various INR levels in deep vein thrombosis cases. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2004 Feb 18;5(1):1. doi: 10.1186/1468-6708-5-1.
98. Gage BF, Bass AR, Lin H, Woller SC, Stevens SM, Al-Hammadi N, et al Effect of Genotype-Guided Warfarin Dosing on Clinical Events and Anticoagulation Control Among Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty: The GIFT Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017 Sep 26;318(12):1115-1124. doi: 10.1001/jama.2017.11469. Erratum in: *JAMA*. 2018 Mar 27;319(12):1281.

ANEXO I. ARTÍCULOS PUBLICADOS

RESEARCH ARTICLE

A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population

Hoi Y. Tong¹, Cristina Lucía Dávila-Fajardo², Alberto M. Borobia^{1,4}*, Luis Javier Martínez-González³, Rubín Lubomirov⁴, Laura María Perea León², María J. Blanco Bañares⁵, Xando Díaz-Villamarín², Carmen Fernández-Capitán⁶, José Cabeza Barrera², Antonio J. Carcas^{1,4}*, PGX-ACE Investigators Group[†]

1 Department of Clinical Pharmacology, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain, **2** Department of Clinical Pharmacy, San Cecilio University Hospital, Institute for Biomedical Research, Ibs, Granada, Spain, **3** Genomics Unit, Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Pfizer-University of Granada-Andalusian Regional Government, Health Sciences Technology Park, PTS, Granada, Spain, **4** Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain, **5** Department of Hematology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, **6** Department of Internal Medicine, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

† Membership of the PGX-ACE Investigators Group is listed in [S1 Appendix](#).

* antonio.carcas@uam.es (AJC); a.borobia@gmail.com (AMB)



OPEN ACCESS

Citation: Tong HY, Dávila-Fajardo CL, Borobia AM, Martínez-González LJ, Lubomirov R, Perea León LM, et al. (2016) A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. PLoS ONE 11(3): e0150456. doi:10.1371/journal.pone.0150456

Editor: Masaru Kato, National Cancer Center, JAPAN

Received: September 10, 2015

Accepted: February 15, 2016

Published: March 15, 2016

Copyright: © 2016 Tong et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by a grant from the Spanish Ministry of Health and Social Policy (Instituto de Salud Carlos III, PI07/0710) and the Andalusian Regional Ministry of Health (Progress and Health Foundation, PI-0717-2013). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

There is a strong association between genetic polymorphisms and the acenocoumarol dosage requirements. Genotyping the polymorphisms involved in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of acenocoumarol before starting anticoagulant therapy would result in a better quality of life and a more efficient use of healthcare resources. The objective of this study is to develop a new algorithm that includes clinical and genetic variables to predict the most appropriate acenocoumarol dosage for stable anticoagulation in a wide range of patients. We recruited 685 patients from 2 Spanish hospitals and 1 primary healthcare center. We randomly chose 80% of the patients ($n = 556$), considering an equitable distribution of genotypes to form the generation cohort. The remaining 20% ($n = 129$) formed the validation cohort. Multiple linear regression was used to generate the algorithm using the acenocoumarol stable dosage as the dependent variable and the clinical and genotypic variables as the independent variables. The variables included in the algorithm were age, weight, amiodarone use, enzyme inducer status, international normalized ratio target range and the presence of *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *VKORC1* (rs9923231) and *CYP4F2* (rs2108622). The coefficient of determination (R^2) explained by the algorithm was 52.8% in the generation cohort and 64% in the validation cohort. The following R^2 values were evaluated by pathology: atrial fibrillation, 57.4%; valve replacement, 56.3%; and venous thromboembolic disease, 51.5%. When the patients were classified into 3 dosage groups according to the stable dosage (<11 mg/week, 11–21 mg/week, >21 mg/week), the percentage of correctly classified patients was higher in the intermediate group, whereas

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

differences between pharmacogenetic and clinical algorithms increased in the extreme dosage groups. Our algorithm could improve acenocoumarol dosage selection for patients who will begin treatment with this drug, especially in extreme-dosage patients. The predictability of the pharmacogenetic algorithm did not vary significantly between diseases.

Introduction

Despite the development of new oral anticoagulants, coumarins are still the most widely used anticoagulants for treating and preventing thromboembolism. Warfarin is the most frequently prescribed coumarin worldwide, although acenocoumarol and phenprocoumon are preferentially used in some countries. Although these vitamin K antagonists are effective for preventing cardioembolic stroke, myocardial infarction and venous thrombosis, they double the incidence of hemorrhage, and this risk is particularly high during the first month of therapy [1]. Accurate dosing of coumarin anticoagulants is challenging due to the wide interindividual and intraindividual variability in the dosage necessary to achieve stable anticoagulation.

In the last decade, the identification of genetic variants influencing the metabolism of coumarins led to the publication of numerous articles focused on the potential of pharmacogenetic information to personalize therapy and to anticipate the best therapeutic dosage for patients starting coumarin treatment. Thus, the use of dosing algorithms that include genetic and non-genetic factors has been the most common strategy for predicting the most appropriate dosage of antivitamin-K oral anticoagulants [2–7].

A wide variety of studies, including several genome-wide association studies (GWAS), have identified the primary genetic variants that influence warfarin and acenocoumarol dosing [8–14]. Patients with variant alleles of *CYP2C9*, the primary enzyme that metabolizes S-warfarin and S-acenocoumarol, require reduced dosages compared with those having wild-type alleles. Warfarin and acenocoumarol dosing variability is also attributable to genetic polymorphisms in vitamin K 2,3 epoxide reductase complex 1 (*VKORC1*). In addition, a subsequent finding revealed that *CYP4F2* genetic variants were associated with a clinically relevant effect on warfarin requirements in the Caucasian population [13].

To obtain personalized warfarin dosages, several models have been developed that include these genetic variants and demographic and clinical factors for various patient populations. These algorithms explain approximately 51–59% of the variation in warfarin doses [4,15–17]. Although warfarin and acenocoumarol are very similar, they differ in their pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and their genetic influence. Warfarin algorithms cannot therefore be applied to acenocoumarol [18].

To date, a number of algorithms have also been published for acenocoumarol in diverse populations. Verde et al. constructed an “acenocoumarol-dose genotype score” based on the number of alleles associated with a higher acenocoumarol dosage taken by each participant for each polymorphism [19]. Two algorithms have been published for Indian populations, which include demographic, clinical and genetic variants, and have obtained coefficients of determinations of 41% and 61.5%, respectively [20,21]. In addition, 3 other algorithms have been developed for European populations. The first algorithm, designed for a mixed population, was published by the European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy (EU-PACT) study group and includes *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms and clinical variables (age, sex, weight, height and amiodarone use). When applied to the EU-PACT cohort, this algorithm explained 52.6% of the dosage variance, whereas the nongenotype algorithm explained 23.7% [22]. Another algorithm was developed by our group (La Paz University Hospital, LPUH) for a cohort of patients with Thromboembolic Venous Disease (TVD) and considers the influence

of clinical variables (age, body mass index [BMI], amiodarone use and enzyme-inducer use) and genetic variations of *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE*. For our entire cohort, this algorithm predicted 56.8% of the dose variance, whereas the clinical factors explained only 19% of the variability [23]. The last algorithm was developed by Cerezo-Manchado et al. in a large cohort of patients undergoing anticoagulation therapy ($n = 973$) and includes clinical factors (age and BMI) and genetic variants (*VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP4F2* polymorphisms). The algorithm explained 50% of the variance in the acenocoumarol dosage, whereas the clinical algorithm explained 16% [24].

The published algorithms differ in the variables included and the variables' weight and show differences in the population and methods used to develop the predictive models. The clinical variables included in the algorithms differ essentially in terms of the inclusion or not of sex or in terms of using weight and height instead of BMI. In addition, a number of algorithms take into account the use of amiodarone and enzyme-inducer drugs while others do not. In terms of the genetic variants, all algorithms included *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms. *CYP4F2* is taken into account in a number of algorithms, and *APOE* is used only by the LPUH group.

LPUH algorithm [23] was developed for a well-defined prospective cohort of patients with TVD [Deep Vein Thrombosis (DVT) and Pulmonary Embolism (PE)], whereas the other algorithms [22,24] have typically included patient cohorts with various anticoagulation indications (valve replacement [VR], atrial fibrillation [AF] and TVD). The objective of this study is to develop a new algorithm in a larger prospective cohort of patients that would be useful for a wider range of patients.

Materials and Methods

Study design and patients

Written informed consent was obtained from all patients prior to their participation in the study. Ethics approval for this study was obtained from both clinical research ethics committees: LPUH of Madrid and San Cecilio University Hospital (SCUH) of Granada, Spain. This was an observational, cross-sectional study. Patients were recruited from the various clinical departments of LPUH of Madrid and SCUH of Granada and a primary health care center (PHCC) belonging to LPUH. Participants included 685 patients who were treated according to the disease in the various departments of the 2 hospitals and the PHCC. Inclusion criteria included acenocoumarol anticoagulation for AF or TVD with a target INR of 2–3, and VR or other diseases (OD) requiring anticoagulation, with a target INR of 2.5–3.5. The participants were taking a stable dosage of acenocoumarol, defined as a weekly dose variation of <20% in the last 3 consecutive months and an INR within 2–3 (AF and TVD) and 2.5–3.5 (VR and OD) for at least the last 3 consecutive months. Exclusion criteria included renal (estimated creatinine clearance ≤ 30 mL/min) and hepatic (Child-Plough stage) impairment, thyroid dysfunction and cancer.

The INR was measured according to the technique used in each recruiting center; all centers have quality certifications with external controls. In LPUH the analysis was performed using a semiautomated Thrombotrack® CoaguLometer (Baxter) with Thrombotest reagents. SCUH used the microINR from iLine microsystems, and PHCC used a portable INRatio (Grifols) coagulometer.

Data collection and genotyping

The collected data included age, sex, race, body weight and height, INR results, acenocoumarol dose administered in the last 3 consecutive months, concomitant medications and target INR

range. Blood samples were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (LPUH) and samples of buccal mucosa cells (SCUH) and stored at -20°C . For DNA extraction, the QuickGene DNA blood kit S (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) was used in LPUH; the DNA extraction procedure in SCUH was performed according to the method previously published by Freeman et al. [25], with a number of modifications described by Gómez-Martín A. et al. [26]. KASPar® (KBiosciences, Hoddesdon, UK), and TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, USA) technologies were used for genotyping. The genotype frequencies were calculated and the distributions tested for Hardy-Weinberg equilibrium.

We randomly chose 80% of the patients ($n = 556$), considering an equitable genotype distribution (*CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2*) to form the generation cohort. The remaining 20% ($n = 129$) formed the validation cohort of the new algorithm.

Statistical analysis

The results for the categorical data were expressed in absolute terms; such as percentages and the comparison between groups were performed using the chi-squared test. The continuous variables were expressed as means and standard deviation (SD) and were compared using Student's t-test and ANOVA.

Univariate analyses were performed for each variable (statistically significant $P \leq .05$); however, those reaching p-values less than 0.1 were included in a multivariate analysis. We ultimately chose multiple linear regression by the enter method to generate the algorithm, given the method would be more easily transformable into a useful equation in routine clinical practice. After this process, we selected those variables with p-values consistently below .05 to be included in the pharmacogenetic algorithm. In the case of variables near significant with biological plausibility and previous evidence of association with acenocoumarol dosing, were also included in the algorithm. The dependent variable was the acenocoumarol dosage required (ln-transformed) to obtain a stable target INR range. As independent variables, we included the selected demographic, clinical and genetic variables. To elucidate the contribution of the patients' demographic and clinical characteristics as currently used in clinical practice, a clinical algorithm was designed including only those variables used in the pharmacogenetic algorithm.

The performance of pharmacogenetic and clinical algorithms was evaluated by calculating the coefficient of determination (R^2) that represents the variability explained by each model. The accuracy and precision of the model were assessed using the mean error (ME; mean of the differences between the predicted and observed acenocoumarol dosages) and the mean absolute error (MAE; mean absolute difference between the predicted and observed acenocoumarol dosages). The ME and MAE were also calculated as the percentages of the observed acenocoumarol dosage (%ME and %MAE). The ME reflects the accuracy of the prediction, and MAE is an estimate of the model's precision.

Clinical relevance

To evaluate the clinical relevance of the model, we classified the patients into 3 groups according to the actual dosage administered: a low-dosage group (<11 mg/week), an intermediate-dosage group (11–21 mg/week) and a high-dosage group (>21 mg/week). We calculated the proportion of patients for whom the predicted dosage was within 20% of the actual dosage (considered correctly dosed). We evaluated the predicted dosage by applying the pharmacogenetic and clinical algorithms.

All analyses were performed using SPSS 16.0 (IBM Inc., IL, USA).

Results

Demographics

The generation cohort consisted of 556 patients; 283 of whom were women (50.9%); the mean (SD) age was 68.7 (0.53) years. The validation cohort consisted of 129 patients, with a mean age of 67.6 (1.3) years, 54 of whom were women (41.9%). There were missing data in both groups: amiodarone use for 2 patients in the generation cohort and the weight and height in 1 patient in the validation cohort. Excluding the patients with missing data, 554 patients comprised the generation cohort, and 128 patients comprised the validation cohort. The clinical and demographic features and genotype frequency of both groups are shown in [Table 1](#). The most common disease in our complete cohort was AF (47%) followed by TVD (29.5%). When comparing the patients' features between the various diseases ([Table 2](#)), we found that patients with AF were older (72.44 ± 0.5 years) and had higher BMI (29.55 ± 0.27) ($p < .001$), and the acenocoumarol dosage (13.49 ± 0.33 mg/week) was significantly lower than that of the other groups ($p < .001$). Regarding the concomitant medication, this group included more patients treated with amiodarone (9%) compared with the groups with other diseases ($p < .001$). There were no differences in the genotype distribution between the various diseases.

Acenocoumarol dose algorithm

The clinical variables that were ultimately included in the algorithm were age (y), weight (kg), amiodarone use, enzyme inducer status and INR target range (2–3 or 2.5–3.5). The genetic variables that remained significant in the algorithm were *CYP2C9*1/*2*, *CYP2C9*1/*3*, *CYP2C9* homozygous variants, *VKORC1* heterozygous, *VKORC1* homozygous variant and the *CYP4F2* homozygous variant. The outcome was the natural logarithm of the mean weekly doses of acenocoumarol ([Table 3](#)). We grouped the polymorphisms of the *CYP2C9* homozygous variants because their function appears to be similar. The *APOE* genotype was not included in the final model because it did not reach statistical significance ($p = .521$, $R^2 = 0.1\%$).

Variability of the pharmacogenetic algorithm

The variability explained by the pharmacogenetic algorithm was 52.8% in the generation cohort and increased to 64%, in the validation cohort, whereas the clinical algorithm explained 13.1% and 21.1% respectively. The accuracy of the pharmacogenetic algorithm in both cohorts was good, with a low calculated ME (-0.11 mg for the generation cohort and 0.04 mg for the validation cohort), whereas the accuracy for the clinical algorithm was higher: -1.55 (6.57) and -1.62 (6.41), respectively. The precision calculated as MAE was good in the pharmacogenetic algorithm: the MAE was 3.77 mg (3.48) in the generation cohort and 3.54 mg (2.99) in the validation cohort. For the clinical algorithm, the MAE was higher 4.99 (4.55) and 5.04 (4.25), respectively. We also calculated the predicted dosage by both algorithms in the entire cohort. For this cohort, the R^2 was 15.1% for the clinical algorithm and 55% for the pharmacogenetic algorithm. The ME and MAE were lower in the pharmacogenetic algorithm, which means that the bias and precision were clearly better in this algorithm ([Table 4](#)).

The predictive performance of the pharmacogenetic algorithm was evaluated by disease. As shown in [Table 5](#), the patient group with the best prediction was the AF group, with an R^2 of 57.4%, followed by the VR group, with an R^2 of 56.3%.

Clinical Relevance

To test the clinical relevance of the algorithm, we calculated the percentage of patients correctly classified within 20% of the actual dosage. The percentage of patients correctly classified by the

Table 1. Patients characteristics in the generation (n = 556) and validation (n = 129) cohorts.

Variables	Generation cohort (n = 556)	Validation cohort (n = 129)	p
Sex, n (%)			
Female/Male	283/273 (50.9/49.1)	54/75 (41.9/58.1)	.078
Mean age, y (SD)	68.7 (12.41)	67.6 (14.80)	.446
Mean weight, kg (SD)	75.8 (14.16)	78.06 (16.26)♦	.147
Mean height, m (SD)	1.62 (0.09)	1.64 (0.10)♦	.107
Mean body mass index, kg/m2 (SD)	28.73 (4.86)	28.93 (4.30)♦	.653
Underlying disease, n (%)			
Thromboembolic venous disease	160 (28.8)	42 (32.6)	
Auricular fibrillation	263 (47.3)	59 (45.7)	
Valve replacement	115 (20.8)	26 (20.2)	
Other diseases	18 (3.2)	2 (1.6)	
Mean acenocoumarol dosage, mg/week (SD)	15.16 (0.30)	15.5 (0.67)	.632
Concurrent medications			
Inductor drugs* [Yes/No], n (%)	107/448 (19.3/80.7)γ	29/100 (22.5/77.5)	.412
Amiodarone [Yes/No], n (%)	27/527 (4.9/94.6)¥	9/120 (7/93)	.380
Phenotype, n (%)			
≤11 mg/week	177 (31.8)	39 (30.2)	
11–21 mg/week	279 (50.2)	62 (48.1)	
≥21 mg/week	100 (18)	28 (21.7)	
CYP2C9 genotype, n (%)			.881
*1/*1	325 (58.5)	77 (59.7)	
*1/*2	138 (24.8)	30 (23.3)	
*1/*3	62 (11.2)	16(12.4)	
*2/*2	12 (2.2)	2 (1.6)	
*2/*3	14 (2.5)	4 (3.1)	
*3/*3	5 (0.9)	0 (0)	
VKORC1 genotype, n (%)			.874
Homozygote wt/wt	202 (36.4)	47 (36.4)	
Heterozygote	277 (49.8)	62 (48.1)	
Homozygote mut/mut	77 (13.8)	20 (15.5)	
CYP4F2 genotype, n (%)			
MM	83 (14.6)	14 (12.3)	.455
APOE rs7412 genotype, n (%)			.621
Homozygote wt/wt	494 (88.9)	116 (89.9)	
Heterozygote	58 (10.4)	13 (10.1)	
Homozygote mut/mut	4 (0.7)	0 (0)	

Abbreviations: SD, standard deviation; mut, mutated; wt, wild type.

* CYP inducers that were considered in this analysis included phenytoin, carbamazepine and rifampin

γ Missing data, n = 555

¥ Missing data, n = 554

♦ Missing data, n = 128

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t001

pharmacogenetic algorithm was 46%, whereas 34% were classified properly with the clinical algorithm (Table 6).

If we classify the patients into the 3 dosage groups (<11 mg/week, 11–21 mg/week, >21 mg/week), we can see that the percentage of patients correctly classified is higher in the intermediate group (11–21 mg/week) for both algorithms, whereas the difference between the 2

Table 2. Patients characteristics according to disease in the entire cohort.

Variables	TVD (n = 202)	AF (n = 322)	VR (n = 141)	OD (n = 20)	p
Sex, n (%)					
Men	100 (49.5)	176 (54.7)	63 (44.7)	9 (45)	.218
Women	102 (50.5)	146 (45.3)	78 (55.3)	11 (55)	
Mean age, y (SD)	66.12 (16.91)	72.44 (8.90)*	64.37 (10.32)	57.65 (15.83)	< .001
Mean weight, kg (SD)	76.51 (16.20)	78.43 (13.44) ¥	70.93 (13.84)	76.15 (10.84)	< .001
Mean height, m (SD)	1.63 (0.091)	1.63 (0.091) ¥	1.61 (0.10)	1.63 (0.083)	.302
Mean body mass index, kg/m ² (SD)	28.67 (5.08)	29.55 (4.77) ¥	27.15 (3.77)	28.81 (4.46)	< .001
Median acenocoumarol dosage, mg/week (range)	15 (2.5–47)	13.49 (3.0–37)*	16.48 (2.0–38.5)	21 (10.0–61.5)	< .001
Concurrent medications, n (%)					
Enzyme inducers †	25 (12.5)	80 (24.8)	26 (18.4)	5 (25)	.006
Amiodarone	2 (1)	29 (9)* ¥	5 (3.5)	0	< .001
Phenotype, n (%)					< .001
<11 mg/week	66 (32.7)	117 (36.3)	31 (22)	2 (10)	
11–21 mg/week	86 (42.6)	169 (52.5)	75 (53.2)	11 (55)	
>21 mg/week	50 (24.8)	36 (11.2)	35 (24.8)	7 (35)	
CYP2C9 genotype, n (%)					.084
Homozygote wt/wt	109 (54)	187 (58.1)	93 (66)	13 (65)	
Heterozygote	84 (41.58)	112 (34.8)	45 (31.9)	5 (25)	
Homozygote mut/mut	33 (16.3)	43 (13.4)	19 (13.5)	2 (10)	
CYP4F2 genotype, n (%)					
MM	26 (12.9)	53 (16.5)	16 (11.3)	2 (10)	.411
APOE rs7412 genotype, n (%)					.311
Homozygote wt/wt	176 (87.13)	292 (90.7)	127 (90.1)	15 (75)	
Heterozygote	24 (11.9)	29 (9)	13 (9.2)	5 (25)	
Homozygote mut/mut	2 (1)	1 (0.3)	1 (0.7)	0	

Abbreviations: AF, atrial fibrillation; OD, other diseases; SD; standard deviation; VR, valve replacement; TVD, thromboembolism venous disease; mut, mutated; wt, wild type.

† CYP inducers that were considered in this analysis included phenytoin, carbamazepine and rifampin

* Group with significant differences compared with other groups

¶ Missing data, n = 201

¥ Missing data, n = 321

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t002

algorithms increases in the extreme-dosage groups. Thus, the pharmacogenetic algorithm correctly classified 32.4% of the low-dosage group, compared with 19.9% using the clinical algorithm. Similarly, the pharmacogenetic algorithm correctly classified 41.4% of the high-dosage group compared with only 6.3% with the clinical algorithm. Differences in the MAE were also significant in the extreme-dosage groups between the 2 algorithms (Table 7).

Published pharmacogenetic algorithms for acenocoumarol show differences in the included clinical/demographic and genetic variables. All account for over 40% of the variability in the dosage of this drug. Table 8 shows the comparisons regarding the performance and included variables between this new algorithm and others.

Discussion

Expensive new oral anticoagulants with a short history of clinical use are being marketed; however, coumarins such as warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon are still the most

Table 3. Pharmacogenetic and clinical algorithms.

		Pharmacogenetic algorithm		
Beta	Variable	P-value	Adj R ² (%)	Cumulative R ² (%)
3.181	Intercept			
-0.010	Age	< .001		
0.005	Weight	< .001		
0.070	Enzyme inducer status	.053		
-0.337	Amiodarone status	< .001		
0.086	INR target range	.014		
	Clinical variables		13.1	13.1
-0.111	<i>CYP2C9</i> *1/*2	< .001		
-0.323	<i>CYP2C9</i> *1/*3	< .0001		
-0.691	<i>CYP2C9</i> *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	< .0001		
	<i>CYP2C9</i>		14.3	27.4
-0.302	<i>VKORC1</i> A/G	< .001		
-0.727	<i>VKORC1</i> A/A	< .001		
	<i>VKORC1</i>		22.9	50.3
0.214	<i>CYP4F2</i> MM	< .001		
	<i>CYP4F2</i>		2.5	52.8
		Clinical Algorithm		
2.951	Intercept			
-0.011	Age	< .001		
0.004	Weight	.013		
0.045	Enzyme inducer status	.357		
-0.290	Amiodarone status	< .001		
0.086	INR target range	.014		
	Clinical variables		13.1	13.1

Beta: standardized regression coefficient

The pharmacogenetic algorithm: natural logarithm of the mean weekly doses of acenocoumarol = 3.181–0.010*age (y) + 0.005*weight (kg) + 0.070 (if enzyme inducer is used)– 0.337 (if amiodarone is used)– 0.111 (if *CYP2C9**1/*2)– 0.323 (if *CYP2C9**1/*3)– 0.691 (if *CYP2C9* homozygote mutated)– 0.302 (if *VKORC1* A/G)– 0.727 (if *VKORC1* A/A) + 0.214 (if *CYP4F2* MM) + 0.086 (if INR target is 2.5–3.5). The outcome is the natural logarithm of the mean acenocoumarol dosage in mg/week.

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t003

frequently prescribed drugs for the management of TVD, AF and VR. The high interindividual variability in the dosage requirements of coumarins has been attributed to several clinical and demographic factors and genetic variations. This high variability markedly affects the time

Table 4. Predictive performance of the pharmacogenetic and clinical algorithms in the generation, validation and entire cohorts.

	Pharmacogenetic Algorithm			Clinical Algorithm		
	Generation Cohort	Validation Cohort	Entire Cohort	Generation Cohort	Validation Cohort	Entire Cohort
R2	52.8%	64%	55%	13.1%	21.1%	15.1%
ME	-0.11 (3.48)	0.04 (4.65)	-0.09 (5.04)	-1.55 (6.57)	-1.62 (6.41)	-1.56 (6.54)
MAE	3.77 (3.48)	3.54 (2.99)	3.73 (3.39)	4.99 (4.55)	5.04 (4.25)	4.99 (4.49)
%ME	10.15 (38.17)	9.95 (35.85)	10.12 (37.72)	9.62 (62.76)	8.95 (54.9)	9.49 (61.32)
%MAE	28.52 (27.3)	26.64 (25.89)	28.17 (27.03)	38.97 (50.1)	38.21 (40.29)	38.83 (48.38)

Abbreviations: ME: mean error (predicted–observed); %ME: mean error expressed as a percentage (%ME = ME/Observed*100); MAE: mean absolute error (= SQR[(Predicted–Observed)²]); %MAE: mean absolute error expressed as a percentage (%MAE = MAE/Observed*100).

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t004

Table 5. Predictive performance of the pharmacogenetic algorithm by disease in the entire cohort (n = 682).

	TVD (n = 202)	AF (n = 322)	VR (n = 141)	OD (n = 20)
R2	51.5%	57.4%	56.3%	45.2%
ME	-1.12 (5.53)	0.59 (4.07)	0.22 (5.16)	-2.59 (9.43)
MAE	4.12 (3.85)	3.28 (2.47)	3.91 (3.36)	5.81 (7.78)
%ME	2.11 (37.19)	15.23 (38.07)	11.47 (36.52)	-1.19 (31.80)
%MAE	26.55 (26.06)	29.68 (28.26)	27.32 (26.73)	26.13 (17.15)

Abbreviations: AF, atrial fibrillation; OD, other diseases; VR, valve replacement; TVD, thromboembolism venous; ME: mean error (predicted–observed); % ME: mean error expressed as a percentage (%ME = ME/Observed*100); MAE: mean absolute error (= SQR[(Predicted-Observed)²]); %MAE: mean absolute error expressed as a percentage (%MAE = MAE/Observed*100).

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t005

within the target INR and the clinical outcomes. Jones et al. showed that a 10% increase in the time out of range was associated with a 29% higher risk of mortality, a 10% increase in the risk of ischemic stroke and a 12% increase in all thromboembolic events [27].

For patients with TVD, the risk of progression, recurrence and death due to PE is greatest in the first weeks after the diagnosis. Despite modern diagnostic and treatment methods, PE continues to have a high mortality rate during the first 3 months, which is probably due to the recurrence of embolism. The frequency of PE could be lowered if more intensive anticoagulation were used [28].

For patients with AF, preventing stroke and thromboembolism are the primary therapeutic goals. For these patients, the expected embolic event rate increases from 2.5% to over 12% per year if they are not properly anticoagulated [29]. Rates of major hemorrhage reported for patients with AF undergoing warfarin treatment range from 1.3 to 7.2 per 100 person-years. Patients with AF tend to be older, have associated comorbidities and take more concomitant medications [29]. The first 90 days are associated with a 3-fold increased risk of major hemorrhage, which is associated with the advanced age of these patients [30]. These data correspond with those of our study; in which patients with AF had the lowest average dose of acenocoumarol, which could increase the likelihood that some patients receive a higher dose of acenocoumarol at the beginning of the treatment. In clinical practice, the estimation of both bleeding and stroke risks are recommended to guide decisions on thromboprophylaxis therapy [31,32].

This study confirms that acenocoumarol algorithms can explain more than 50% of the interindividual variability in the most appropriate dosage of acenocoumarol for stable anticoagulation. The algorithm previously designed and validated by our group was developed for a patient cohort with TVD [23]. Given the fact that these patients are typically younger, have less comorbidity and take fewer concomitant medications, we believe this algorithm might not be useful for other diseases that require anticoagulation with acenocoumarol due to the differences (mainly demographic and clinical) between patients with TVD and those with other

Table 6. Patients correctly classified (predicted dose within ± 20% of the actual dosage) by genetic and clinical algorithms in the generation, validation and entire cohorts (n = 682).

	% Correctly classified		p-value
	Pharmacogenetic algorithm	Clinical algorithm	
Generation cohort (n = 554)	46.9%	34.7%	< .001
Validation cohort (n = 128)	46.5%	34.1%	< .001
Entire cohort (n = 685)	46.9%	34.5%	< .001

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t006

Table 7. Patients correctly classified (predicted dose within ± 20% of actual dosage) and MAE from the entire cohort (n = 682) by genetic and clinical algorithms according to dosage groups.

Dosage Group	Pharmacogenetic algorithm	Clinical Algorithm	Difference	p-value*
Low (≤11 mg/week)				
% correctly classified	32.4%	19.9%	12.5%	< .001
Mean MAE (SD)	3.12 (2.32)	4.37 (2.78)	1.25 (3.01)	< .001
95% CI			0.85 to 1.66	
Median (11–21 mg/week)				
% correctly classified	58.1%	54.5%	3.6%	.118
Mean MAE (SD)	3.01 (2.32)	3.15 (2.36)	0.14 (2.97)	.403
95% CI			0.18 to 0.45	
High (≥21 mg/week)				
% correctly classified	41.4%	6.3%	34.8%	< .001
Mean MAE (SD)	6.64 (5.26)	10.92 (5.93)	4.28 (3.76)	< .001
95% CI			3.62 to 4.93	

Abbreviations: CI, confidence interval; MAE, mean absolute error (= $\text{SQRT}[(\text{predicted}-\text{observed})^2]$); SD, standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t007

diagnoses. Nevertheless, Jimenez-Varo et al., in a recently published study, reported that implementation of the algorithm previously designed by our group led to the highest percentage of correctly classified patients (40.7%) compared with the other algorithms published to date for acenocoumarol [33].

The algorithm described here leads to similar results as those from other algorithms [22,24] performed for the European population regarding the factors influencing stable dosages of coumarins. The most important factors for dosage prediction are the *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes, whereas *CYP4F2* has less influence. Regarding clinical variables, age and weight were the most important clinical factors for dosage prediction. Other variables we found significant, such as concomitant medications and target INR, are not consistently included in published algorithms.

When considering the entire cohort, this algorithm explained 55% of the interindividual variability of the most appropriate acenocoumarol dosage; clinical variables explained only 15.1% of this variability. The results show that the inclusion of genetic variables greatly increases the predictability of the dosage required for each patient. Algorithms published for other populations would not be comparable with the results of this algorithm. There are variations in the frequency of polymorphisms among various ethnic groups; some genes have more impact on one ethnic group than another. Thus, in the study performed on the Northern Indian population [20], *VKORC1* and *CYP4F2* polymorphisms were the principal genetic variables, whereas in the algorithm developed for Southern Indians and those for the European population, *VKORC1* and *CYP2C9* are the genetic factors that contribute most to the performance of these algorithms. Furthermore, our algorithm differs from those published for the Indian population [20,21]; the authors of that algorithms included *GGCX* gene polymorphisms (rs11676382), which we do not.

When the predictive performance of the pharmacogenetic algorithm was evaluated by disease, the best prediction was for the AF group (R^2 of 57.4%), which was similar to the R^2 found for the VR group. For the patients with TVD, the variability explained for the algorithm was somewhat lower ($R^2 = 51.5\%$). However, the MAE and %MAE were similar in all groups, confirming that the algorithm worked similarly for all groups.

Not surprisingly, when using standard starting dosages or dosages based on clinical variables, most of the incorrectly dosed patients were those who needed low or high

Table 8. Comparison of performance and variables included in the various acenocoumarol algorithms.

Algorithms	R ² Derivation cohort	R ² Validation cohort	CLINICAL VARIABLES											GENETIC VARIABLES							
			Age	Sex	Weight	Height	Body mass index	Body surface area	Amiodarone use	Enzyme inducer use	Smoking status	Indication for surgery	Target INR	CYP2C9	VKORC1	CYP4F2	APOE	GGCX			
EU-PACT	(n = 375) 52.6%	(n = 168) 49%	X	X	X	X	X		X									X	X		
LPUH (First algorithm)	(n = 117) 60.6%	(n = 30) 38.8%	X				X		X									X	X		X
Cerezo- Manchado	(n = 973) 50%	(n = 2683) 51%	X				X											X	X		X
Rathore (North Indians)	(n = 125) 41.4%	NA	X	X	X	X	X		X									X	X		X
Kumar (South Indians)	(n = 217) 61.5%	NA	X				X											X	X		X
Our Algorithm	(n = 554) 52.8%	(n = 128) 64%	X	X	X	X	X		X									X	X		X

Abbreviations: CI, confidence interval; EU-PACT, European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy; LPUH, La Paz University Hospital; MAE, mean absolute error (= SQR [(predicted-observed)²]); NA, not applicable; SD, standard deviation

doi:10.1371/journal.pone.0150456.t008

acenocoumarol dosages. These are the patients we can expect to benefit most from the pharmacogenetic algorithm. In this study, the percentage of patients for whom the pharmacogenetic algorithm would have improved acenocoumarol dosing when compared with a clinical algorithm would have been approximately 12.7% (87 patients out a total of 685). Most were patients needing low dosages (27 patients) and notably higher dosages (45 patients). The former would have been overdosed for a number of weeks (until clinical dose adjustments reached a stable INR) and could have been at risk of bleeding, whereas the latter could have been underdosed and would have been at risk of thromboembolic events.

There were differences between the 2 algorithms published by our group regarding the variables included. On one hand, we included the target INR variable in this new algorithm, as justified by the different target INRs for the various diagnoses. We found that the target INR had a modest but significant influence (see [Table 3](#)). On the other hand, the contribution of *APOE* to the total variability was not confirmed in this study because it was not significant ($p = 0.521$, $R^2 = 0.1\%$), and was therefore not included in the algorithm. The inclusion in the algorithm of the taking of certain drugs such as enzyme inducers and amiodarone, is also justified by data in the literature on their influence on the coumarin dose and, as we have seen in the model, their influence is significant (beta of 0.070 and -0.337 respectively). Amiodarone intake was one of the variables included in the algorithm published by the EU-PACT group, with a similar result (beta of -0.377).

The usefulness of pharmacogenetic algorithms in a clinical setting has been tested in 3 published clinical trials, 2 of which were performed with warfarin and 1 with acenocoumarol and phenprocoumon. In 2013, a randomized trial of genotype-guided acenocoumarol dosing showed that the pharmacogenetic algorithm, which included clinical and genetic variables, did not improve the percentage of time in the therapeutic INR range during the 12 weeks after the start of therapy compared with the clinical algorithm [34]. The EU-PACT group, however, reported that pharmacogenetics-based warfarin dosing was better than standard dosing, with a higher percentage of time in the therapeutic INR range than traditional clinical dosages during the start of warfarin therapy [35]. The results of these studies are controversial in terms of the applicability of pharmacogenetic algorithms, and certainly there are variables that are not included in these algorithms, which in the context of clinical trials cannot be controlled.

Pharmacogenetic algorithms have typically been developed by collecting information from individuals with various demographic, clinical and genetic characteristics. Both clinical and pharmacogenetic algorithms show similar accuracy in predicting the dose of wild-type genotype patients; however, algorithms that integrate genetic information are more accurate and useful for patients with allelic variants because these patients often have extreme dosages of acenocoumarol, for whom INR stabilization becomes more difficult and time-consuming to achieve.

There are a number of limitations in this study. A number of parameters that have also been linked to changes in the required stable coumarins dosages were not included, such as smoking status, other concomitant medications and the dietary vitamin K intake. All are important factors to keep in mind when establishing a stabilized dosage of acenocoumarol.

In conclusion, our new algorithm can provide better prediction, when compared with the clinical algorithm, of the ideal acenocoumarol dosage for a broad spectrum of patients who are starting treatment with this drug, particularly those who need extreme dosages. The performance of the pharmacogenetic algorithm is similar for patients with different diseases despite the demographic and clinical variations among the patients.

Supporting Information

S1 Appendix. PGx-ACE Investigation Group.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HYT CDF AMB LMG AJC. Performed the experiments: HYT CDF AMB LMG RL LPL MBB XDV CFC JCB AJC and the PGX-ACE Investigators Group. Analyzed the data: HYT CDF AMB RL AJC. Contributed reagents/materials/analysis tools: HYT CDF AMB LPL MBB XDV JCB AJC. Wrote the paper: HYT CDF AMB LMG RL LPL MBB XDV CFC JCB AJC.

References

- Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med.* 1993 Sep; 95(3):315–28. PMID: [8368229](#)
- Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116(22):2563–70. PMID: [17989110](#)
- Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE, Grosso L, Eby C, Deych E, et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007; 110(5):1511–5. PMID: [17387222](#)
- Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106(7):2329–33. PMID: [15947090](#)
- Zambon CF, Pengo V, Padriani R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, et al. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics* 2011; 12(1):15–25. doi: [10.2217/pgs.10.162](#) PMID: [21174619](#)
- Moreau C, Pautas E, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahé I, Mulot C, et al. Predicting the warfarin maintenance dose in elderly inpatients at treatment initiation: accuracy of dosing algorithms incorporating or not VKORC1/CYP2C9 genotypes. *J Thromb Haemost* 2011; 9(4):711–18. doi: [10.1111/j.1538-7836.2011.04213.x](#) PMID: [21255252](#)
- Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87(5):572–8. doi: [10.1038/clpt.2010.13](#) PMID: [20375999](#)
- Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009 Mar; 5(3):e1000433. doi: [10.1371/journal.pgen.1000433](#) PMID: [19300499](#)
- Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, Hofman A, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 1; 18(19):3758–68. doi: [10.1093/hmg/ddp309](#) PMID: [19578179](#)
- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet.* 1999 Feb 27; 353(9154):717–9. PMID: [10073515](#)
- Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2000 Nov; 28(11):1284–90. PMID: [11038154](#)
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 2005 Jun 2; 352(22):2285–93. PMID: [15930419](#)
- Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood.* 2008 Apr 15; 111(8):4106–12. doi: [10.1182/blood-2007-11-122010](#) PMID: [18250228](#)
- Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood.* 2009 May 14; 113(20):4977–9. doi: [10.1182/blood-2008-09-176222](#) PMID: [19270263](#)
- Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Sep; 84(3):326–31. doi: [10.1038/clpt.2008.10](#) PMID: [18305455](#)
- Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Oct; 90(4):625–9. doi: [10.1038/clpt.2011.185](#) PMID: [21900891](#)

17. Michaud V, Vanier MC, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, et al. Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 May; 83(5):740–8. PMID: [18030307](#)
18. Hermans JJ, Thijssen HH. Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep; 110(1):482–90. PMID: [8220911](#)
19. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Valle B, Bandrés F, Calvo E, et al. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS One* 2010; 5(6): e11210. doi: [10.1371/journal.pone.0011210](#) PMID: [20585445](#)
20. Rathore S, Agarwal S, Pande S, Singh S, Mittal T, Mittal B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: Proposal of a Population Specific Pharmacogenetic Dosing Algorithm and Its Validation in North Indians. *PLoS One* 2012; 7(5):e37844. doi: [10.1371/journal.pone.0037844](#) PMID: [22629463](#)
21. Krishna Kumar D, Shewade DG, Loriot MA, Beaune P, Sai Chandran BV, Balachander J, et al. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015 Feb; 71(2):173–81. doi: [10.1007/s00228-014-1791-x](#) PMID: [25519826](#)
22. Rianne MF, van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J* 2011; 32(15):1909–17. doi: [10.1093/eurheartj/ehr116](#) PMID: [21636598](#)
23. Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One.* 2012; 7(7):e41360. doi: [10.1371/journal.pone.0041360](#) PMID: [22911785](#)
24. Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martínez AB, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb Haemost.* 2013 Jan; 109(1):146–53. doi: [10.1160/TH12-08-0631](#) PMID: [23196355](#)
25. Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. *Behavior genetics.* 2003; 33(1), 67–72. PMID: [12645823](#)
26. Gómez-martín A, Hernández AF, Martínez-gonzález LJ, González-alzaga B, Rodríguez-barranco M, López-flores I. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere.* 2015; 139, 534–540. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.07.079](#) PMID: [26318115](#)
27. Jones M, McEwan P, Morgan C, Peters JR, Goodfellow J, Currie CJ. Evaluation of the pattern of treatment level of anticoagulation control and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart* 2005; 91:472–477 PMID: [15772203](#)
28. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet* 1999; 353:1386–92 PMID: [10227218](#)
29. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Borowsky LH, Henault LE, Chang Y, et al. Implications of stroke risk criteria on the anticoagulation decision in nonvalvular atrial fibrillation: The anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study (2000) *Circulation,* 102 (1), pp. 11–13. PMID: [10880408](#)
30. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation.* 2007 May 29; 115(21):2689–96. PMID: [17515465](#)
31. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2014 Nov 14; 35(43):3033–69, doi: [10.1093/eurheartj/ehu283](#) PMID: [25173341](#)
32. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest.* 2008; 133:S454–545.
33. Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Garcés-Robles V, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernández MÁ. Extrapolation of acenocoumarol pharmacogenetic algorithms. *Vascul Pharmacol.* 2015 Jun 27. pii: S1537–1891(15) 00141-X. doi: [10.1016/j.vph.2015.06.010](#) [Epub ahead of print]
34. Verhoef TI, Ragia G, de Boer A, Barallon R, Kolovou G, Kolovou V, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N Engl J Med.* 2013 Dec 12; 369(24):2304–12. doi: [10.1056/NEJMoa1311388](#) PMID: [24251360](#)
35. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med.* 2013 Dec 12; 369(24):2294–303. doi: [10.1056/NEJMoa1311386](#) PMID: [24251363](#)



Influence of two variants of CYP450 oxidoreductase on the stable dose of acenocoumarol in a Spanish population

Aim: To evaluate the influence of two variants of P450 oxidoreductase (POR), rs2868177 and *POR*28*, on the stable dosage of acenocoumarol. **Patients & methods:** For this observational, cross-sectional study, patients were undergone stable anticoagulant treatment with acenocoumarol. Univariate and multiple regression analyses were performed to assess the influence of *POR* polymorphisms. **Results:** About 340 patients were enrolled. Multiple regression had a coefficient of determination (R^2) of 51.5% and an Akaike information criterion of 234.22. The inclusion of *POR*28* polymorphisms increased the R^2 to 52.0% and reduced the Akaike information criteria to 230.58. The *POR*28* heterozygote showed statistical significance in the algorithm. **Conclusion:** The *POR*28* heterozygote appears to be associated with the stable dose of acenocoumarol, but its clinical contribution to the prediction of the dosing of this drug is minimal.

First draft submitted: 29 January 2017; Accepted for publication: 18 March 2017;
Published online: 8 June 2017

Keywords: acenocoumarol • anticoagulant • CYP450 • CYP450 oxidoreductase • pharmacogenetics • POR

One of the objectives of the pharmacogenetics is identified mechanisms that underlie individual variations in drug response in order to optimize the use of drugs based on individual genetics data. The majority of clinically used drugs are metabolized by hepatic type II CYP450 enzymes that require the activity of P450 oxidoreductase (POR). POR transfers electrons from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to all microsomal (type II) CYP450 enzymes [1,2]. The human *POR* gene is located on chromosome 7, and some studies have shown that the gene encoding human POR is highly polymorphic. Because many drugs are oxidized by microsomal CYPs that require POR for electron transfer, polymorphisms affecting POR activity can lead to differences in drug metabolism [3] and potentially to variations in the effects of clinically used drugs.

Miller *et al.* showed that the influence of a *POR* variant on one P450 isoform would not predict its activity on another [2].

Several *POR* polymorphisms have been shown to affect POR activity and to affect CYP450-mediated drug metabolism [3–5]. The 1508C>T SNP (rs1057868; *POR*28*) is the most common *POR* polymorphism and encodes the amino acid variant A503V; its frequency varies from 20 to 40% in various populations [3], making it one of the best studied ones. Lesche *et al.* concluded that *CYP3A5*3* and *POR*28* variant carriers have a lower tacrolimus dose requirement in heart transplantation; therefore, the authors suggest that the latter might additionally contribute to the observed variability [6]. Nevertheless, Jannot *et al.* concluded that *POR*28* does not influence tacrolimus pharmacokinetic parameters in patients with kidney transplant [7].

Hoi Y Tong¹, Alberto M Borobia^{*1,2}, José Carlos Martínez Ávila¹, Rubín Lubomirov², Mario Muñoz¹, María J Blanco Bañares³, Rafael Hernández¹, Carmen Fernández Capitán⁴, Elena Ramírez^{1,2}, Jesús Frías^{1,2} & Antonio J Carcas^{**1,2}

¹Clinical Pharmacology Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain

²Pharmacology Department, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain

³Haematology Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain

⁴Internal Medicine Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain

⁵UICEC of La Paz University Hospital, Spanish Clinical Research Network (SCReN), IdiPAZ, Madrid, Spain

*Author for correspondence: a.borobia@gmail.com

**Author for correspondence: antonio.carcas@uam.es

Some *in vitro* studies have also shown that POR activity was positively correlated with the activity of *CYP2C9* [4]; this influence has been evaluated in a limited number of studies. Subramanian *et al.* showed that the *POR*28* polymorphism increases the activity of the three *CYP2C9* isoforms [8]. Meanwhile, Ragia *et al.* found that carriage of *CYP2C9*2* with a *POR*1/*1* genotype had higher risk of developing hypoglycemia with sulfonylurea treatment, whereas association was not found in patients with *CYP2C9*2* and various genotypes of the *POR*28* (**1/*28* or **28/*28*). This shows that the *POR*28* allele, in combination with *CYP2C9* gene polymorphisms, might explain interindividual variability in the effect of sulfonylureas [9].

Similarly, studies on *POR* influences on the stable dose of warfarin are not conclusive. Zhang *et al.* found that three SNPs (-173C>A, -208C>T and rs2868177) were significantly associated with variations in warfarin maintenance dose [10]. However, Tan *et al.* studied the impact of *POR*28* and rs2868177 on the stable maintenance dose of warfarin in 317 Han Chinese patients, finding no significant influence on this population [11].

Although warfarin and acenocoumarol are similar drugs, there are differences in their pharmacokinetics and pharmacodynamics as well as in the weight of genetic influences. As mentioned earlier, results regarding evidence for the contribution of *POR* polymorphisms to warfarin effect have been contradictory.

In the search for the best algorithm, our group designed two pharmacogenetic dosing algorithms for acenocoumarol, with positive results. The first one was used on a cohort of patients with thromboembolic disease and was able to explain 60.6% (R^2) of the variability in the stable acenocoumarol dose; SNPs of *VKORC1* (A/G and A/A), *CYP2C9* (**1/*3* and homozygous mutated), *CYP4F2* (MM) and *APOE* (rs7412-T/T) were included [12]. The other algorithm was used on patients with various pathologies requiring oral anticoagulation. In this case, the variability explained by this pharmacogenetic algorithm was 55%; the genetic variables included were the same as in the first algorithm except the *APOE* that was not maintained and the inclusion of *CYP2C9*1/*2* [13]. To the best of our knowledge, there are no studies assessing the influence of *POR* polymorphisms on patients treated with acenocoumarol. In this new study, we sought to identify the possible influence of two *POR* polymorphisms (*POR*28* and rs2868177) on the stable dose of acenocoumarol in a subset of the patients included for the development of our previous algorithms and from whom *POR*

genotyping was available. Also, we assessed whether the inclusion of *POR* polymorphisms would increase the variability explained by the pharmacogenetic algorithm.

Patients & methods

A total of 340 Caucasian patients were enrolled from various departments in La Paz University Hospital and a referring primary care center between 2008 and 2013. The patients were receiving stable anticoagulant treatment with acenocoumarol for auricular fibrillation, venous thromboembolic disease and/or cardiac valve replacement (VR).

All the included patients were receiving a stable dose of acenocoumarol (weekly dose variation of <20% in the last 3 months) and had an international normalized ratio (INR) within the range of 2–3 (auricular fibrillation and venous thromboembolic disease) or 2.5–3.5 (VR) for at least the 3 previous consecutive months. Exclusion criteria included renal failure (calculated creatinine clearance ≤ 30 ml/min), hepatic disease (stage C of Child Plough stage), thyroid dysfunction and cancer.

For each patient, the data obtained included age, sex, race, body weight and height (and calculated BMI), INR results, acenocoumarol dose administered in the last 3 months and concomitant medications (amiodarone and enzyme inducer status). A blood sample was collected for *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2*, *APOE* and two variants of *POR* genotyping, and was stored at -20°C before DNA isolation. All the procedures were performed during the patient's visit to the clinic for INR measurement.

To evaluate the influence of both SNPs of *POR*, we applied the last pharmacogenetic algorithm published by our group [13].

Genotyping

The *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *VKORC1* (-1639 G→A rs9923231), *CYP4F2* (rs2108622) and *APOE* (8016 C→T rs7412) genotyping techniques used have been published previously [12,13]. The two new SNPs on the *POR* gene (rs2868177 and rs1057868 [*POR*28*]) were genotyped using Taqman® technology (Applied Biosystems®, CA, USA).

Statistical analysis

A χ^2 -test for goodness of fit was used to determine the Hardy–Weinberg equilibrium. We used the Kolmogorov–Smirnov test to evaluate the normal distribution of continuous variables. The results for frequency are expressed in absolute terms, such as percentages and CIs. Continuous variables are

expressed as means (standard deviation) or median (range) according to the normality test. All the statistical tests were two sided with a significant p-value of <0.05.

A univariate analysis was performed to evaluate the influence of *POR*28* and *POR* (rs2868177) polymorphisms on the stable dose of acenocoumarol, and a multivariate linear regression analysis was performed to assess the variability in the stable dose of acenocoumarol with and without both *POR* polymorphisms. We used the same demographic, clinical and genetic variables included in our last published algorithm [13], obtaining the coefficient of determination (R^2) and the Akaike information criteria (AIC) to evaluate the potential improvement provided by the inclusion of *POR* polymorphisms [14].

All these analyses were performed using the statistical environment R [15] with RStudio [16].

Results

A total of 340 Caucasian patients were enrolled. Of these, 48% of the patients were male and the mean age was 69.83 ± 13.62 years; mean BMI was 28.15 ± 4.46 . The primary clinical indication for anticoagulation was thromboembolic disease (43.2%), followed by atrial fibrillation (36.2%). The demographic and clinical characteristics of the study populations are shown in Table 1. The frequencies of genotype variables are also shown.

We did not obtain *POR*28* results for one patient. The frequencies of *POR*28* genotypes were as follows: 122 individuals (36%) were heterozygous (*POR*1/*28*) and 21 patients (6.2%) were homozygous mutated (*POR*28/*28*). For the SNP rs2868177, there were 148 heterozygous individuals (43.5%) and 25 patients were homozygous mutated (7.3%); these frequencies did not differ from those

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the cohort.	
Variables	n = 340
Sex, n (%):	
– Male	165 (48.5)
– Female	175 (51.5)
Age (year); mean (SD)	69.83 (13.62)
Weight (kg); mean (SD)	73.66 (14.09)
Height (m); mean (SD)	1.62 (9.52)
BMI (kg/m ²); mean (SD)	28.15 (4.46)
Clinical indications for acenocoumarol treatment, n (%):	
– Thromboembolic disease	147 (43.2)
– Auricular fibrillation	123 (36.2)
– Valve replacement	70 (20.6)
Acenocoumarol weekly dose, mean (SD)	14.93 (6.66)
Concurrent medications, n (%):	
– Enzyme inducers ^{†‡}	9 (2.7)
– Amiodarone [‡]	13 (3.8)
Phenotype, n (%):	
– <11 mg/week	116 (34.1)
– 11–21 mg/week	158 (46.5)
– >21 mg/week	66 (19.4)
<i>CYP2C9</i> genotype, n (%):	
– *1/*1	201 (59.1)
– *1/*2	93 (27.4)

[†]CYP inducers that were considered in this analysis included phenytoin, carbamazepine and rifampin.
[‡]Missing data, n = 338.
[§]Missing data, n = 339.
SD: Standard deviation.

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the cohort (cont.).	
Variables	n = 340
<i>CYP2C9</i> genotype, n (%) (cont.):	
– *1/*3	35 (10.3)
– *2/*2	6 (1.8)
– *2/*3	5 (1.5)
<i>VKORC1</i> genotype, n (%):	
– G/G	120 (35.3)
– A/G	168 (49.4)
– A/A	52 (15.3)
<i>CYP4F2</i> genotype, n (%):	
– MM	45 (13.2)
<i>APOE</i> rs7412 genotype, n (%):	
– C/C	300 (88.2)
– C/T	37 (10.9)
– T/T	3 (0.9)
<i>POR*28</i> (rs1057868), n (%) [§] :	
– C/C	196 (57.8)
– C/T	122 (36)
– T/T	21 (6.2)
<i>POR</i> (rs2868177), n (%):	
– A/A	167 (49.1)
– A/G	148 (43.5)
– G/G	25 (7.3)

[†]CYP inducers that were considered in this analysis included phenytoin, carbamazepine and rifampin.
[‡]Missing data, n = 338.
[§]Missing data, n = 339.
SD: Standard deviation.

Table 2. Effects of *POR28 on different variants of *CYP2C9* in the stable dose of acenocoumarol. Univariate analysis.**

<i>CYP2C9</i> variants	Variants <i>POR</i> *28	n	Mean stable dose (mg/week)	SD	95% CI	p-value
<i>CYP2C9</i> *1/*1	<i>POR</i> *1/*1	116	16.06	6.97	14.78–17.35	0.664
	<i>POR</i> *1/*28	73	16.37	5.93	14.98–17.75	
	<i>POR</i> *28/*28	11	14.44	6.59	10.01–18.87	
	Total	200	16.09	6.57	15.17–17.00	
<i>CYP2C9</i> *1/*2	<i>POR</i> *1/*1	53	14.03	6.59	12.21–15.85	0.129
	<i>POR</i> *1/*28	35	15.87	6.58	13.63–18.16	
	<i>POR</i> *28/*28	5	10.10	3.81	5.36–14.84	
	TOTAL	93	14.52	6.57	13.17–15.87	
<i>CYP2C9</i> *1/*3	<i>POR</i> *1/*1	20	10.62	4.79	8.38–12.87	0.146
	<i>POR</i> *1/*28	11	11.09	4.93	7.78–14.40	
	<i>POR</i> *28/*28	4	16.50	8.89	2.36–30.64	
	TOTAL	35	11.44	5.51	9.55–13.34	
<i>CYP2C9</i> *2/*2	<i>POR</i> *1/*1	3	11.00	1.00	8.51–13.48	0.499
	<i>POR</i> *1/*28	2	16.50	9.19	-66.09–99.09	
	<i>POR</i> *28/*28	1	9.00	–	–	
	TOTAL	6	12.50	5.24	6.99–18.00	
<i>CYP2C9</i> *2/*3	<i>POR</i> *1/*1	4	5.13	2.17	1.66–8.59	0.497
	<i>POR</i> *1/*28	1	7.00	–	–	
	Total	5	5.50	2.06	2.94–8.06	

SD: Standard deviation.

reported in the literature [17]. The allele frequencies of the SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Univariate analysis

The stable dose of acenocoumarol did not differ significantly between *POR**28 genotypes (14.7 [6.90] mg/week in *POR**1/*1, 15.7 [6.2] mg/week in *POR**1/*28 and 13.5 [6.5] mg/week in *POR**28/*28; $p = 0.247$). Nor were there any significant differences in the stable dose among carriers of the three variants of *POR* rs2868177 (AA: 15.3 [6.7] mg/week, AG: 14.7 [6.6] mg/week and GG: 13.8 [6.4] mg/week; $p = 0.526$). After simple linear regression analysis we also found no association between the stable dose of acenocoumarol and genotypes of *POR**28 polymorphism (*1/*1; *1/*28, *28/*28; $p = 0.469$) or *POR* rs2868177 polymorphisms (WT/WT, WT/MUT, MUT/MUT; $p = 0.199$).

We also evaluated the influence of *POR**28 or *POR* rs2868177 polymorphisms nested on the various genotypes of *CYP2C9* on stable dose of acenocoumarol, aiming to observe any interaction (Tables 2 & 3). No statistically significant difference was detected in the patient’s mean dose of acenocoumarol between different variants of *CYP2C9* and polymorphisms

of both *POR*s. Therefore, the difference observed between polymorphisms of *CYP2C9* was independent of the presence of these *POR* variant polymorphisms.

Multivariate analyses

We performed a multivariate regression analysis using the log-transformed weekly stable dose of acenocoumarol as an independent variable; as dependent variables, we included the same demographic, clinical and genetic variables included in our last published pharmacogenetic algorithm [13]. In this multivariate analysis, *POR**1/*28 yielded a significant p-value in the model. The coefficient of determination obtained without the inclusion of *POR**28 was 51.5%, and after including *POR**28 polymorphisms, the R^2 increased to 52%; the AIC values were 234.22 and 230.58, respectively (Table 4). Regarding *POR* rs2868177, it was not significant in the model, and its inclusion did not modify the coefficient of determination (R^2 of 51.5%), whereas the AIC value was higher (236.74; Table 5).

Clinical relevance

To evaluate the clinical relevance, we classified the patients into the three dosage groups: low

(≤11 mg/week), intermediate (11–21 mg/week) and high (≥21 mg/week), and for each group we calculated the percentage of patients correctly classified within 20% of the stable dosage. The greater number of correctly classified patients was in the intermediate dosage (52.5%), followed by patients with a low-dosage requirement, and finally the high-dosage group (38.8 and 31.8%, respectively). After inclusion of *POR**28 polymorphisms in the algorithm, the percentage of patients correctly classified remained almost unchanged in the extreme-dosage groups (37.9 and 30.3%, respectively), whereas in the intermediate-dosage group, the number of patients correctly classified increased by 7% (from 52.5 to 59.5%; $p = 0.016$; see Table 6).

Discussion

The genetic sources of the widely observed inter-individual variability in acenocoumarol dose have been intensively studied in recent years. The primary genetic variants associated with acenocoumarol response involve *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE*, which, in addition to some clinical variables, explain approximately 50% of the variability. Several models including demographic, clinical and

genetic variables for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon have been developed for different populations aiming to individualize the dosing and to improve management of these drugs. To date, at least four algorithms have been developed in the European population for acenocoumarol [12–13,18–19]. Unfortunately, controlled studies testing its effectiveness have shown conflicting and disappointing results, at least for acenocoumarol. Along these lines, Verhoef *et al.* [20] concluded that there were not significant differences in the time in the therapeutic INR range for the genotype-guided dosing group compared with the clinically guided dosing group (61.6 vs. 60.2%; $p = 0.52$). For warfarin, a clinical trial by Pirmohamed *et al.* [21] showed that genotype-guided dosing at the beginning of the warfarin treatment increased the time in the therapeutic range by 7% compared with standard dosing.

POR polymorphisms are potential candidates to further explain at least part of the variability found to date in the response to acenocoumarol and warfarin (a maximum of 50–60%). The actual effect of the activity of *POR* on acenocoumarol is still unknown. Human *POR* is a highly polymorphic gene; thus,

Table 3. Effects of *POR* rs2868177 on different variants of *CYP2C9* in the stable dose of acenocoumarol. Univariate analysis.

<i>CYP2C9</i> variants	Variants rs2868177	n	Mean stable dose (mg/week)	SD	95% CI	p-value
<i>CYP2C9</i> *1/*1	<i>POR</i> WT/WT	96	16.50	6.81	15.12–17.88	0.626
	<i>POR</i> WT/MUT	87	15.67	6.51	14.28–17.06	
	<i>POR</i> MUT/MUT	18	15.33	5.96	12.37–18.30	
	Total	201	16.04	6.59	15.12–16.95	
<i>CYP2C9</i> *1/*2	<i>POR</i> WT/WT	50	14.46	6.28	12.68–16.24	0.841
	<i>POR</i> WT/MUT	39	14.78	7.02	12.50–17.05	
	<i>POR</i> MUT/MUT	4	12.75	7.04	1.55–23.95	
	Total	93	14.52	6.57	13.17–15.87	
<i>CYP2C9</i> *1/*3	<i>POR</i> WT/WT	14	12.25	6.32	8.60–15.90	0.239
	<i>POR</i> WT/MUT	18	11.67	4.88	9.24–14.10	
	<i>POR</i> MUT/MUT	3	6.33	3.22	-1.66–14.33	
	Total	35	11.44	5.51	9.55–13.34	
<i>CYP2C9</i> *2/*2	<i>POR</i> WT/WT	4	13.50	6.45	3.23–23.77	0.570
	<i>POR</i> WT/MUT	2	10.50	0.71	4.14–16.86	
	Total	6	12.50	5.24	6.99–18.00	
<i>CYP2C9</i> *2/*3	<i>POR</i> WT/WT	3	6.67	0.58	5.24–8.10	0.124
	<i>POR</i> WT/MUT	2	3.75	2.47	-18.49–25.99	
	Total	5	5.50	2.06	2.94–8.06	

SD: Standard deviation.

its relationship with drug metabolism is unclear. Most studies suggest that the influence of *POR* polymorphisms on CYP450 isoenzyme activity depends on the substrate and CYP450 isoform involved; for some drugs an increase in activity is shown, whereas in others there is a reduction. Agrawal *et al.* concluded that a difference in substrate size could also imply discrepancies with respect to the *POR**28 effect [5]. In another study, de Jonge *et al.* [22] reported a gain of *CYP3A5* activity linked to the *POR**28 allele in the immunosuppressant tacrolimus. Elens *et al.* [23] indicated, however, that the *POR**28 variant is associated with a reduction in *CYP3A5* activity toward midazolam. Moreover, Ragia *et al.* found no association between the *POR**28 allele and the lipid-lowering effect of simvastatin and atorvastatin [24].

As for *CYP2C9*, Subramanian *et al.* [8] evaluated the effect of *POR* variants in three substrates (diclofenac, flurbiprofen and tolbutamide) and concluded that the *POR**28 variant increased *CYP2C9* activity, compared with wild-type *POR*. In contrast, the R457H and A287P variants of *POR* were associated with reduced activity in all *CYP2C9* variants and in all substrates. Therefore, there is no unique behavior of the various *POR* polymorphisms in the CYP450 system, and studies are needed to determine the influence of each drug.

Data on the association of a stable dose of warfarin with *POR* polymorphisms are also controversial. A study by Zhang *et al.* [10] proved for the first time the association between *POR* rs2868177, *POR* -173C>A and *POR* -208C>T with the interindividual variation in warfarin dose requirements. *POR* 173C>A and

Table 4. Multivariate linear regression analysis using the same variables included in our last published pharmacogenetic algorithm and adding *POR28 polymorphisms.**

Algorithms	Beta	Variable	p-value	AIC	Adjusted R ² (%)
Intercept	3.205				
Clinical variables				423.42	13.7
	-0.010	Age	< 0.001		
	0.005	Weight	0.001		
	0.177	Enzyme inducer status	0.123		
	-0.269	Amiodarone status	0.008		
	0.020	INR target	0.677		
Genetic variables				234.22	51.5
	-0.086	<i>CYP2C9</i> *1/*2	0.044		
	-0.282	<i>CYP2C9</i> *1/*3	< 0.001		
	-0.568	<i>CYP2C9</i> *2/*2 or <i>CYP2C9</i> *2/*3	< 0.001		
	-0.263	<i>VKORC1A/G</i> (WT/MUT)	< 0.001		
	-0.794	<i>VKORC1A/A</i> (MUT/MUT)	< 0.001		
	0.212	<i>CYP4F2MM</i>	< 0.001		
<i>POR</i> *28				230.58	52.0
	0.081	*1/*28 (WT/MUT)	0.041		
	-0.038	*28/*28 (MUT/MUT)	0.627		

Beta: Standardized regression coefficient; Pharmacogenetic algorithm: Natural logarithm of the mean weekly doses of acenocoumarol = 3.205 - (0.010*age) + (0.005*weight) + 0.177 (if enzyme inducers user) - 0.269 (if amiodarone user) + 0.020 (if INR target >2.5) - 0.086 (if *CYP2C9**1/*2) - 0.282 (if *CYP2C9**1/*3) - 0.568 (if *CYP2C9* homozygote mutated) - 0.263 (if *VKORC1 A/G*) - 0.794 (if *VKORC1 A/A*) + 0.212 (if *CYP4F2 MM*) + 0.081 (if *POR**1/*28) - 0.038 (if *POR**28/*28).
 AIC: Akaike information criterion; INR: International normalized ratio.

Table 5. Multivariate linear regression analysis using the same variables included in our last published pharmacogenetic algorithm and adding *POR* (rs2868177) polymorphisms.

Algorithms	Beta	Variable	p-value	AIC	Adjusted R ² (%)
Intercept	3.236				
Clinical variables				423.42	13.7
	-0.010	Age	< 0.001		
	0.005	Weight	0.001		
	0.182	Enzyme inducer status	0.115		
	-0.337	Amiodarone status	0.001		
	0.035	INR target	0.464		
Genetic variables				234.22	51.5
	-0.085	<i>CYP2C9</i> *1/*2	0.047		
	-0.285	<i>CYP2C9</i> *1/*3	< 0.001		
	-0.577	<i>CYP2C9</i> *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	< 0.001		
	-0.262	<i>VKORC1</i> A/G	< 0.001		
	-0.797	<i>VKORC1</i> A/A	< 0.001		
	0.224	<i>CYP4F2</i> MM	< 0.001		
<i>POR</i> (rs2868177)				236.74	51.5
	-0.018	WT/MUT	0.640		
	-0.087	MUT/MUT	0.239		

Beta: Standardized regression coefficient; Pharmacogenetic algorithm: Natural logarithm of the mean weekly doses of acenocoumarol = 3.236 - (0.010*age) + (0.005*weight) + 0.182 (if enzyme inducers user) - 0.337 (if amiodarone user) + 0.035 (if INR target >2.5) - 0.085 (if *CYP2C9**1/*2) - 0.285 (if *CYP2C9**1/*3) - 0.577 (if *CYP2C9* homozygote mutated) - 0.262 (if *VKORC1* A/G) - 0.797 (if *VKORC1* A/A) + 0.224 (if *CYP4F2* MM) - 0.018 (if *POR* WT/MUT) - 0.087 (if *POR* MUT/MUT).
AIC: Akaike information criterion; INR: International normalized ratio.

208C>T were negatively associated with warfarin dose, whereas *POR* rs2868177 was positively associated; the estimated contribution by the three *POR* SNPs in this study was at least 4%. On the other hand, Tan *et al.* [11] published a study conducted on Han Chinese patients with mechanical heart VR and concluded that SNPs of *POR* rs2868177 and *POR**28 did not significantly affect the stable warfarin dose. Also, in the single linear regression, neither of the two *POR* polymorphisms was associated with the stable dose of warfarin ($p > 0.1$) and they were excluded from the final model in the multiple linear regression.

According to the prior knowledge about the *POR* mechanism of action, our hypothesis was that there could be an interaction between *CYP2C9* and the *POR* variants evaluated. To the best of our knowledge, this is the first study assessing its association with acenocoumarol dose.

In this study, in addition to the calculation of R², we used the AIC to evaluate the contribution of *POR**28 and *POR* rs2868177 to the performance of the pharmacogenetic algorithm in predicting the acenocoumarol stable dose in a mixed population. The model with the lowest AIC value was the one including polymorphisms of *POR**28, and this variable remained statistically

Table 6. Percentage of correctly classified patients (predicted dose within ± 20% of the actual dosage) according to phenotype, using the pharmacogenetic algorithm with and without *POR28 polymorphisms.**

Phenotype	Pharmacogenetic algorithm without <i>POR</i> *28 (%)	With <i>POR</i> *28 algorithm (%)	Difference	p-value
Low (≤11 mg/week)	38.8	37.9	-0.9	0.764
Median (11–21 mg/week)	52.5	59.5	7.0	0.016
High (≥21 mg/week)	31.8	30.3	-1.5	0.658

significant within the model. However, its inclusion in the algorithm increased the value of R^2 only marginally, by 0.5%. We believe, therefore, that the contribution of *POR*28* to the variability in the stable acenocoumarol dose is very low and does not substantially improve the global performance of our pharmacogenetic algorithm.

The clinical relevance of the findings was evaluated by the percentage of patients correctly classified within each phenotypic group (low, intermediate and high dose). Thus, it appears that the inclusion of *POR*28* polymorphisms can improve the performance of the pharmacogenetic algorithm in the intermediate group, but it did not practically improve the prediction in the most relevant extreme-dosage groups.

On the other hand, we did not find any evidence that *POR* rs2868177 is associated with the stable dose of acenocoumarol or improved the performance of our pharmacogenetic algorithm.

Our study has some limitations. First, the low number of patients with reduced *CYP2C9* activity limits the power to demonstrate their interaction with the *POR* genotype. However, the study has at least an 80% power to demonstrate a change of 2% in the variation in acenocoumarol stable dose. Second, although we evaluated the two most frequent variants of *POR* described in the literature as the most influential in drug metabolism, we cannot discard the potential influence of other *POR* variants on acenocoumarol dosing. Also it would be interesting to be able to assess the global influence of *POR* variants (including other SNPs of the *POR* gene) in a larger cohort of patients.

In conclusion, although *POR*28* heterozygote appears to be statistically associated with the stable dose of acenocoumarol, its contribution to the predictive potential of our previously validated algorithm is low and probably with low clinical relevance; hence, we consider that its inclusion in the pharmacogenetic algorithm of acenocoumarol is not warranted.

Acknowledgements

The authors would like to give special thanks to the doctors and nurses from the Barrio del Pilar primary care centre, who collaborated in this study.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported in part by a grant from the Spanish Ministry of Health and Social Policy (Instituto de Salud Carlos III, PI07/0710 and EC11–210). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

Written informed consent was obtained from all the patients prior to their participation in the study. Ethical permission for this study was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of La Paz University Hospital of Madrid, Spain.

Summary points

- The CYP450 oxidoreductase (POR) can participate in the metabolic pathways of acenocoumarol.
- *POR* polymorphisms are potential candidates to further explain at least part of the variability in the response to acenocoumarol.
- Demographic, clinical and pharmacogenetic factors can predict between 50 and 60% of the variability of the dose of acenocoumarol.
- *POR* rs2868177 was not significant in the model and its inclusion did not modify the coefficient of determination and increased the Akaike information criterion value.
- The inclusion of *POR*28* polymorphisms in the pharmacogenetic algorithm reduced the Akaike information criterion value from 234.22 to 230.58 and increased the coefficient of determination by a mere 0.5%.
- After inclusion of *POR*28* polymorphisms in the algorithm, the percentage of patients correctly classified in the intermediate-dosage group (11–21 mg/week) increased by 7% ($p = 0.016$) but not in the low- and high-dose groups.
- *POR*1/*28* yielded a significant p -value in the multivariate analysis, it may be associated with the stable dosing of acenocoumarol, but its clinical significance seems to be very limited.

References

- 1 Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146(6), 2544–2550 (2005).
- 2 Miller W, Huang N, Agrawal V, Giacomini K. Genetic variation in human *P450* oxidoreductase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 180–184 (2009).
- 3 Huang N, Agrawal V, Giacomini K, Miller W. Genetics of *P450* oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(5), 1733–1738 (2008).
- 4 Hart SN, Wang S, Nakamoto K, Wesselman C, Li Y, Zhong XB. Genetic polymorphisms in cytochrome *P450*

- oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism. *Pharmacogenet. Genomics* 18(1), 11–24 (2008).
- 5 Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet. Genomics* 20(10), 611–618 (2010).
 - 6 Lesche D, Sigurdardottir V, Setoud R *et al.* CYP3A5*3 and POR*28 genetic variants influence the required dose of tacrolimus in heart transplant recipients. *Ther. Drug Monit.* 36(6), 710–715 (2014).
 - 7 Jannot AS, Vuillemin X, Etienne I *et al.* A lack of significant effect of POR*28 allelic variant on tacrolimus exposure in kidney transplant recipients. *Ther. Drug Monit.* 38(2), 223–229 (2016).
 - 8 Subramanian M, Agrawal V, Sandee D, Tam HK, Miller WL, Tracy TS. Effect of P450 oxidoreductase variants on the metabolism of model substrates mediated by CYP2C9.1, CYP2C9.2, and CYP2C9.3. *Pharmacogenet. Genomics* 22(8), 590–597 (2012).
 - 9 Ragia G, Tavridou A, Elens L, Van Schaik RH, Manolopoulos VG. CYP2C9*2 allele increases risk for hypoglycemia in POR*1/*1 Type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 122(1), 60–63 (2014).
 - 10 Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab. Dispos.* 39(8), 1433–1439 (2011).
 - 11 Tan SL, Li Z, Zhang W *et al.* Cytochrome P450 oxidoreductase genetic polymorphisms A503V and rs2868177 do not significantly affect warfarin stable dosage in Han–Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69(10), 1769–1775 (2013).
 - 12 Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E *et al.* An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS ONE* 7(7), e41360 (2012).
 - 13 Tong HY, Dávila-Fajardo CL, Borobia AM *et al.* A new pharmacogenetic algorithm to predict the most appropriate dosage of acenocoumarol for stable anticoagulation in a mixed Spanish population. *PLoS ONE* 15, 11(3), e0150456 (2016).
 - 14 Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19(6), 716–723 (1974).
 - 15 R Core Team. A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2013).
 - 16 RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. (2015).
 - 17 NCIB. dbSNP short genetic variations: Reference SNP (refSNP) cluster report: rs286817. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
 - 18 Rianne MF, van Schie RM, Wessels JA *et al.* Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur. Heart J.* 32(15), 1909–1917 (2011).
 - 19 Cerezo–Manchado JJ, Rosafalco M, Antón AI *et al.* Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb. Haemost.* 109(1), 146–153 (2013).
 - 20 Verhoef TI, Ragia G, de Boer A *et al.* A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2304–2312 (2013).
 - 21 Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N *et al.* A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N. Engl. J. Med.* 369(24), 2294–2303 (2013).
 - 22 de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 12(9), 1281–1291 (2011).
 - 23 Elens L, Nieuweboer AJ, Clarke SJ *et al.* Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenet. Genomics* 23(3), 148–155 (2013).
 - 24 Ragia G, Kolovou V, Tavridou A *et al.* Lack of association of the P450 oxidoreductase *28 single nucleotide polymorphism with the lipid-lowering effect of statins in hypercholesterolemic patients. *Mol. Diagn. Ther.* 18(3), 323–331 (2014).
 - 25 Friedman J, Tibshirani R, Hastie T. *The Elements of Statistical Learning*. Springer, NY, USA (2009).



Published in final edited form as:

Clin Pharmacol Ther. 2019 June ; 105(6): 1477–1491. doi:10.1002/cpt.1323.

Effect of *CYP4F2*, *VKORC1*, and *CYP2C9* in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals

A full list of authors and affiliations appears at the end of the article.

Abstract

The cytochrome P450 (*CYP*)*4F2* gene is known to influence mean coumarin dose. The aim of the present study was to undertake a meta-analysis at the individual patients level to capture the possible effect of ethnicity, gene—gene interaction, or other drugs on the association and to verify if inclusion of *CYP4F2**3 variant into dosing algorithms improves the prediction of mean coumarin dose. We asked the authors of our previous meta-analysis (30 articles) and of 38 new articles retrieved by a systematic review to send us individual patients' data. The final collection consists of 15,754 patients split into a derivation and validation cohort. The *CYP4F2**3 polymorphism was consistently associated with an increase in mean coumarin dose (+9% (95% confidence interval (CI) 7–10%), with a higher effect in women, in patients taking acenocoumarol, and in white patients. The inclusion of the *CYP4F2**3 in dosing algorithms slightly improved the prediction of stable coumarin dose. New pharmacogenetic equations potentially useful for clinical practice were derived.

Coumarins have proved to be effective in the treatment of thromboembolic disease and despite the introduction of direct oral anticoagulants, they remain one of the most widely prescribed family of drugs worldwide.¹

The narrow therapeutic index and high interindividual variability in therapeutic dose make coumarin therapy difficult to manage. Many studies have showed two genes, cytochrome P450 (*CYP*)*2C9* and *VKORC1*, which are associated with variation in warfarin, phenprocoumon, and acenocoumarol maintenance doses requirement and have suggested some clinical benefits from genotype-guided dosing.² On the basis of such data, the US Food and Drug Administration has updated the label for warfarin twice, advising that two

Correspondence: Cristiano Fava (cristiano.fava@univr.it; cristiano.fava@med.lu.se).

†E.D. and S.R. contributed equally to the work.

‡J.A.J. and C.F. contributed equally to the work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.D., S.R., C.F., and J.A.J. wrote the manuscript. E.D., S.R., M.M., J.A.J., A.T., and C.F. designed the research. A.T., A.G., M.M., E.D., T.L., P.B., C.C., A.J.C., A.M.B., H.Y.T., C.D.-F., M.R.B., S.B., P.D., M.D.C., J.K.B., R.L.B., L.H.C., K.D., M.H., L.-Z.Z., H.-J.C., R.G.-C., V.R., Y.N., T.M., I.Y.G., R.B.K., K.H., K.I., C.I., L.B., E.J.-V., M.C.-G., M.K.K., K.B.F.H., H.S.G., K.E.L., M.T.M.L., S.A.L., S.S., C.M., L.S., E.G., M.Ö., A.P., R.K., A.P., V.S., M.-A.L., V.K.K., G.S.-K., J.P., J.C.D., A.H.R., B.M., S.S.R., H.S., R.A., M.H.A.S., S.I.K., N.A.L., C.R., A.S., C.D., I.M.S., H.-H.Z., S.-L.T., V.T., V.L., Y.Z., A.H.M.-vdZ., T.I.V., A.dB., M.T., C.F.Z., V.P., J.E.Z., M.P., and J.A.J. performed the research. E.D., S.R., A.G., C.F., and P.M. analyzed the data.

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary information accompanies this paper on the *Clinical Pharmacology & Therapeutics* website (www.cpt-journal.com).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no competing interests for this work.

variants in the *CYP2C9* gene (C144R and I359L) and one in the Vitamin K epoxide Reductase Complex subunit 1 (*VKORC1*) gene (G-1639A) might be taken into consideration when initiating warfarin therapy (warfarin product labeling, US Food and Drug Administration https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/009218s107lbl.pdf).

Although there have been contradictory results in randomized clinical trials (RCTs) about the utility of genotype-guided dosing of coumarin drugs when compared with either standard clinical care or clinical algorithms,^{3–5} a recent RCT in patients under-going elective hip or knee arthroplasty⁶ showed superiority of genetic dosing compared with clinical dosing. Some, but not all, meta-analyses have also shown an improvement in clinical end points, such as bleeding events.^{3,7–11} Moreover, none of the trials included in the meta-analyses included *CYP4F2**3 polymorphism (1347C>T; c.1297G>A; p.Val433Met; rs2108622), whose effect on coumarin dose was discovered later when compared with *CYP2C9* and *VKORC1*.

Our previous meta-analysis performed on aggregate data from 30 studies showed that *CYP4F2* variation was associated with nearly 8% higher coumarin doses in T allele carriers. Indeed, a possible gene–gene interaction and an effect of race on the genetic effect were detected.¹² Despite the low effect size, *CYP4F2* is currently regarded as the third most influential genetic locus with respect to coumarin drug maintenance dose. Older studies, which compared pharmacogenetic algorithms with either clinical-based algorithms or fixed-dose approach, did show a possible improvement in prediction only in selected subgroups.^{13,14} The incorporation of *CYP4F2* into existing models might improve the accuracy of dose prediction with coumarins.^{15,16} Recently, the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium updated the guidelines for *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes and warfarin dosing, including evidence from the published literature for the nonsynonymous variant *CYP4F2**3 (1347C>T; c.1297G>A; p.Val433Met; rs2108622), which was found to be significantly associated with altered dose requirements for coumarin anticoagulants.² In order to clarify the actual clinical utility of including the *CYP4F2* polymorphism into pharmacogenetic dosing algorithms, some essential information is needed. Thus, we performed a meta-analysis at the individual patients level to understand the real effect size of this polymorphism and to test how much either a possible gene–gene interaction or the effect of ethnicity or other covariates could modify the pharmacogenetic association and prove to be useful in creating new pharmacogenetic equations. We hereby provide the largest meta-analysis of *CYP2C9*, *VKORC1*, and *CYP4F2* polymorphisms affecting the dose of warfarin and acenocoumarol in samples collected from 25 different countries, including more than 15,000 participants treated with coumarin drugs. New pharmacogenetic equations potentially useful for clinical practice have been derived for different ethnic groups.

RESULTS

Characteristics of included studies

Starting from the 30 articles included in our previous meta-analysis (search from inception until August 2011), individual patient data were obtained from 19 studies.^{17–35} From one coauthor we obtained an additional dataset related to an article not previously included

because no data about the *CYP4F2* polymorphism were present in the original publication.³⁶ From the group of 38 articles retrieved from the new search (from September 1, 2011, to September 14, 2016), individual patient data were obtained from 18 studies (Figure 1).^{15,16,37–52}

Thus, 38 articles were included in the present work from authors who agreed to share individual patient data: 20 from the first systematic search and 18 from the second systematic search. Data from one study were divided into two distinct cohorts according to the main author's subdivision of sample into discovery and validation cohorts.⁴⁶ Moreover, data from two studies had been collected in one cohort.^{15,43} Finally, data from one study was divided into two cohorts: one cohort treated with acenocoumarol and the other with phenprocoumon treatment.⁴⁴ This resulted in 39 cohorts that were considered for the meta-analysis, including a total of 15,754 patients. Characteristics of the individual studies are summarized in Table 1. Thirty-one cohorts examined the association between *CYP4F2* polymorphism and the maintenance dose of warfarin; seven cohorts evaluated this association for acenocoumarol and one for phenprocoumon. Information on *CYP4F2*, *VKORC1*, and *CYP2C9*3* genotyping were available for all 39 cohorts, whereas *CYP2C9*2* genotype was recorded for 35 of the 39 cohorts (89.7%). All studies but one¹⁹ included both male and female participants with a minimum of 24% men. One study selected very elderly patients (mean age 86.7 years).³⁵ Data on body mass index (BMI) and drugs known to potentially interfere with warfarin were available for 31 and 27 cohorts, respectively. All studies were published between 2006 and 2016.

Association between *CYP4F2*3* polymorphism and stable coumarin dose

Figure 2 shows the forest plot for the difference in log dose of warfarin for subjects with at least one T allele (CT + TT) *CYP4F2* as compared to wild-type (CC) subjects, according to a dominant model. The estimated effect size was 0.09 (95% confidence interval (CI) 0.07–0.10), corresponding to a 9% increase in mg/week (95% CI 7–10%). The funnel plot (see Figure S1) is compatible with no effect of bias on publication.

Separate estimates for CT and TT *CYP4F2* genotypes are reported in Figure S2: the estimated effect size for CT vs. CC subjects is 0.07 (95% CI 0.06–0.08), corresponding to a 7% increase in mg/week; whereas for TT vs. CC subjects it is 0.17 (95% CI 0.15–0.19), corresponding to a 19% increase in mg/week. In Table 2, the analysis of the available subgroups highlights that the effect of the *CYP4F2*3* polymorphism is significant in whites and Asians but not in blacks and other ethnic groups. Moreover, there was a significant difference by gender for the effect of the *CYP4F2* polymorphism on coumarin dose (the effect is significantly higher in women) and by type of coumarin drugs (the effect was lower for warfarin as compared to acenocoumarol). No significant difference in the effects of smoking, target International Normalized Ratio (INR), adjustment for other drugs, consistency of genotype frequencies with the Hardy-Weinberg equilibrium, quality score, and other polymorphisms was found (Table 2). The figures for the different meta-analyses in subgroups are presented in Figures S3 and S4.

Stable coumarin dose predictive model

Table 3 presents the predictive model for logarithm of stable coumarin dose according to patients' clinical and genetics characteristics. As statistical test for model fit (R^2) is reported for both the test and validation cohorts. Looking at our calculated model on the whole dataset, adjusted R^2 was slightly higher for models including *CYP4F2*3* polymorphisms than for models without *CYP4F2*3* for all the ethnic groups except blacks (for warfarin dose, adjusted R^2 for models with and without *CYP4F2*3* polymorphism were, respectively, 0.51 and 0.50 for whites, 0.43 and 0.42 for Asians, and 0.27 and 0.27 for blacks). For cohorts that included black patients, addition of the *CYP2C9*5* single-nucleotide polymorphism (SNP) to the models did not result in substantial improvement of the adjusted R^2 (Table 3). Further prediction models also including concomitant drugs (amiodarone, etc.) and smoking habits are presented in Table S1.

Beta coefficients for single-gene and gene–gene interaction are presented in Table 4 for each ethnicity and drug subgroups.

The effect of potentially interacting drugs could be evaluated only on a subsample of the cohorts and is presented in Table S2. Patients taking amiodarone or drugs classified as CYP inhibitors required a lower dose, whereas patients taking CYP inducers required a higher dose of coumarin drugs. If the effect of the drugs was considered, the beta estimate for *CYP4F2* and the other SNPs varied slightly but remained significant for most analyses. No significant interaction between SNPs and drugs were detectable apart from *CYP2C9*2* and rifampin and all CYP inhibitors and all CYP inducers in white patients consuming acenocoumarol. Another weak but nominally significant interaction was present between *CYP2C9*2* and statin or aspirin in black patients on chronic warfarin therapy (Table S2).

The comparison of R^2 of our model with those calculated for two previously published models are reported in Table S3 and are basically comparable, ranging from 0.41–0.47 for whites, 0.44 for Asians, and from 0.23–0.33 for blacks.

DISCUSSION

In our previous meta-analysis on the effect of the *CYP4F2* rs2108622 (1347C>T; c.1297G>A; p.Val433Met; *CYP4F2*3*), we found that the estimated effect size was nearly 10%. In this individual patient data meta-analysis, we have not only confirmed this finding in a larger cohort of primary studies that include all the available study-specific covariates but can add other important findings. Contrary to what was found in the first meta-analysis, a slight but significant effect of gender was identified such that men had a lower effect of the T allele when compared to women.

Indeed, a higher dose of coumarin drugs was needed in carriers of the T allele if they were whites or Asians but not in blacks or in other ethnic groups (Indians, browns from Brazil, and Egyptians), but the latter is probably a reflection of the lower sample size. We also identified differences between different coumarin drugs: patients taking acenocoumarol and carrying the T allele needed a higher dose of the drug when compared with patients taking warfarin and carrying the same polymorphism.

There was no effect of other possible important covariates, such as smoking, age, and indication for coumarin, and no interactions with the other relevant polymorphisms were found.

Evaluation of the beta estimate of the tested SNPs confirmed that the larger effect is due to the *VKORC1* followed by *CYP2C9*, whereas *CYP4F2* had a limited effect size.

Looking at primary studies, the large majority of them are in line with the results of the meta-analysis, and only 4 of the 39 have a central point of the estimate below the 0 line. Even the point estimate for the effect of *CYP4F2* is not so different between primary studies. The extremes are the study performed by Borgiani *et al.*¹⁸ with a + 0.26 estimate and the one by Isaza *et al.*⁴⁸ with a -0.05, which have a 95% CI that is around + 0.07, not far from our total effect size (slightly < 10%).

However, the funnel plot shows a certain asymmetry, almost significant when analyzed using Egger's test. It is therefore possible that unpublished negative studies could affect the real estimate of the effect of the *CYP4F2*3* polymorphism.

Differently from our previous meta-analysis, we could also add drugs as moderating parameters at least in some subgroups, and as expected, this evaluation decreased heterogeneity.

The functionality of the *CYP4F2* polymorphism has been shown in relation to the production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid derived by arachidonic acid and in differences in mRNA production by liver cells in carriers of different alleles.⁵³

The interaction of the *CYP4F2* polymorphism with gender is not unexpected: also in other studies exploring other cardiovascular actions, some CYP polymorphisms have shown a differential effect in men and women probably due to an interaction with either androgens or estrogens.⁵⁴ Even in animal models these differences are evident, at least for blood pressure determination.⁵⁴

Due to our large sample size, we could calculate and subsequently validate different prediction models that included the effect of the *CYP4F2*3*, the other well-known polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1*, and the other covariates differentiating the effect of gender and ethnicity and obtaining discrete coefficient of determinations that indicate a good fit of the models. Other predictive pharmacogenetic equations estimating coumarin dose have been developed using large samples sizes,^{13,14} but both the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium and the "Warfarin dosing" equations used only *CYP2C9* and *VKORC1* genetic variation to estimate warfarin dose and the R^2 estimate for the final model (which also included amiodarone), obtaining values of 0.47 and 0.53, respectively. These results are in line with our data for white subjects, but our results are more generalizable because multiple cohorts from Europe were also included. In fact, Gage's equation is derived from a more homogeneous group of patients collected in three centers in the United States (St. Louis, San Antonio, and Gainesville) with a fourth trial included in the validation cohort.¹³ By contrast, the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium collected 21 research groups from 9 different countries and finally included only patients with a target

INR between 2 and 3 ($n = 5,052$). Their final model was not divided according to ethnicity but instead the ethnicity variable was added in the model. Indeed, outlier patients were excluded from the final analysis. It is worth mentioning that the final sample size of our study is more than two times the previous studies for warfarin, and we have also calculated predictive models for acenocoumarol.

Even if newer anticoagulants have substantially changed clinical practice, especially in developed countries, the use of coumarin drugs is still widespread in the world, so that equations like the one derived from our study will be clinically useful for many years. The importance of genotype has been further shown in the Effective aNticoagulation with factor xA next GEneration in Atrial Fibrillation-Thrombolysis In Myocardial Infarction (ENGAGE AF-TIMI) 48 trial, which compared the clinical efficacy of edoxaban, a direct oral anticoagulant, with warfarin in a prespecified genetic subanalysis. Stratification of patients according to *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms revealed that of the three groups identified, normal responders, sensitive responders, and highly sensitive responders, the last group was found to spend a greater proportion of time over-anticoagulated compared with normal responders but only for the first 90 days of treatment.⁵⁵

RCTs using not only the *CYP2C9* and *VKORC1* poly-morphism but also the *CYP4F2* polymorphism have recently been performed. In nonvalvular atrial fibrillation, no apparent advantage was found for the group randomized to genotype base dose,⁵⁶ but in a recent trial in patients aged 65 years or older initiating warfarin for elective hip or knee arthroplasty conducted at six US medical centers, genotyping reduced the combined risk of major bleeding, INR of 4 or greater, venous thromboembolism, or death.⁶

In another trial that compared a genotype-guided algorithm vs. physician management for the initiation of acenocoumarol, a higher proportion of patients in the genetic group reached and maintained a steady dose than patients randomized to routine practice when starting oral anticoagulation.⁵⁷

Limitations and strengths of the study

Our individual data meta-analysis has limitations. First, although we applied a sensitive search strategy for the retrieval of potentially eligible studies, we cannot rule out the possibility that some relevant studies might not have been included. Indeed, not all the potentially eligible studies were added to the meta-analysis because the authors did not share individual patients' data. Second, adjustment for certain covariates, such as amiodarone, was possible in only a limited sample of patients. The quality score of the included studies was heterogeneous, ranging from 3–7 (median: 5), but this did not affect *CYP4F2*3*–coumarin dose association, because we found no statistically significant difference in the estimates for studies with lower and higher quality score. Finally, our genotyping-based algorithms in blacks have low predictivity even including the *CYP2C9*5* poly-morphism, probably because we could not include more variants in *CYP2C9* that were demonstrated to be especially important in this ethnic group.² Because the exclusion of specific *CYP2C9* variants from the dosing algorithm in blacks can lead to overdosing, we would recommend against the use of the specific dosing algorithms in patients of African ancestry² until more specific algorithms have been developed.

Strengths of our collaborative study are the large sample size with several ethnic groups allowing for generalizability of the results and the possibility to have equations not only for warfarin but also for acenocoumarol based on a quite large sample size. The heterogeneity was low possibly because most of the variables associated with mean coumarin dose have been considered in our models.

CONCLUSION

In conclusion, we have undertaken the largest individual patient data meta-analysis, including the *CYP4F2* polymorphism, in patients taking warfarin or other coumarin drugs. Our data show that the *CYP4F2* rs2108622 polymorphism affects the dose requirements of these drugs in whites and Asians but not in blacks or other ethnic groups. We also provide reliable prediction models, which can guide physicians to estimate the stable dose of warfarin according to genotypes, anthropometric and demographic factors, ethnicity, and the use of other drugs.

Regardless, because RCTs that tested genetic prediction models with the *CYP4F2**3 SNP showed contradictory results,^{6,56} the utility of these models in clinical practice needs to be established in further RCTs before their widespread utilization in clinical settings.

METHODS

Search strategy and eligibility criteria

The 30 articles included in our previous meta-analysis were considered all potentially eligible for the present study.¹² To expand our search to articles published after the date fixed for final inclusion in the previous meta-analysis, we searched Medline and Web of Science from September 1, 2011, to September 14, 2016, by applying the same search algorithm used previously (see Supplementary Material S1) and found 38 additional studies that could potentially be included (see Figure 1) according to the inclusion criteria (see Supplementary Material S1). All 68 studies evaluated for inclusion were clinical cohort or cross-sectional studies that have performed genotyping of *CYP4F2* in combination with *CYP2C9* (at least one of the two variants of interest) and/or *VKORC1* in coumarin-treated patients. As per our previous study, we considered the following polymorphisms: rs2108622 (1347C>T; 1297G>A; p.Val433Met; *CYP4F2**3) for *CYP4F2*, rs1799853 (430C>T) and rs1057910 (1075A>C) for *CYP2C9* (also known as *CYP2C9**2 and *CYP2C9**3), and rs9923231 (-1639 G>A) for *VKORC1*. In relation to the latter variant, we also included data from studies that used the two alternative polymorphisms: rs9934438 (1173C>T) in the *VKORC1* gene, which is in complete linkage disequilibrium with the reference polymorphism and rs10871454 (-1168C>T) located in the Syntaxin 4 A- (*STX4A*) gene, flanking the *VKORC1* gene, which showed a linkage disequilibrium of 0.99 with the reference polymorphism.

In our previous analysis, consistent with published studies, the performance of our regression was low, especially in black subjects, in which an effect of other SNPs especially in *CYP2C9* is considered important. Thus, in the five cohorts in which at least the *CYP2C9**5 variant was available we repeated the analysis by adding this polymorphism.

Data collection

We asked the first/last or corresponding authors of the retrieved primary studies to participate in a collaborative meta-analysis on individual patient data. Authors who were willing to collaborate were finally included if their original database contained the following mandatory data for single patients: gender, age, race, genotypes, indication for coumarin therapy, INR target, type of coumarin used, and maintenance dose. Additional information on body weight, height, and use of interacting drugs were also recorded when available. Each cohort has been assigned to one single study unless otherwise specified. For studies containing overlapping samples we considered the first published study or the one that enrolled the largest number of patients. Data were harmonized into a pooled database. Two researchers (E.D. and M.M.) cross-checked trial details provided by the authors against published articles. Any inconsistencies were discussed with the original trialists, and corrections were made when appropriate. As for our previous meta-analysis, we graded the quality of epidemiologic studies in general, applying items taken from the Newcastle–Ottawa Quality Assessment Scale for Cohort Studies indicators specific to the quality of genetic association studies, and indicators specific for coumarin (e.g., stable anticoagulation). Quality assessment also included departure from Hardy-Weinberg equilibrium that was calculated by the χ^2 test in controls. We applied a scale with a maximum score of seven points (see Supplementary Material S1 for details).

Statistical analysis

Two-stage analysis for the association between *CYP4F23 polymorphism and stable coumarin dose.**—We calculated study-specific estimates, with 95% CIs, for the difference in log dose of coumarin for subjects with at least one *CYP4F2*T allele (CT + TT) compared to wild-type (CC) subjects, according to a dominant model. Separate estimates for CT and TT genotypes were also calculated as a sensitivity analysis. These study-specific estimates were obtained by fitting general linear models with log dose of coumarin as the dependent variable and *CYP4F2**3 polymorphism as the independent variable. All the models were adjusted for available study-specific covariates, including age, gender, race, BMI, smoking status, indication for coumarin treatment, INR target, concomitant drugs, *CYP2C9**2 and *3 polymorphisms, and *VKORC1* polymorphism.

Following the two-stage analysis approach, we pooled study-specific estimates with random-effects models, using the DerSimonian and Laird method (see Supplementary Methods S1). We evaluated homogeneity among study-specific estimates by the *Q* statistic and I^2 , which represents the percentage of total variation across studies that is attributable to heterogeneity rather than to chance (see Supplementary Methods S1). We performed metaregression analysis to assess the influence on Summary Estimates of different study features: type of drugs (acenocoumarol/warfarin), gender, ethnicity (whites/Asians/blacks/others), INR target (< 2.5/2.5/> 2.5), current smoking status, study adjustment for concomitant drugs (yes/no), deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, quality score (< 5/≥ 5), *CYP2C9**2/*3 (wild-type/any polymorphism), and *VKORC1* (wild-type/any poly-morphism). When significant differences according to specific study factors were suggested by metaregression, stratified analyses were performed for *CYP4F2**3–coumarin dose association on subgroups of significant factors.

We assessed possible participation bias by drawing funnel plots and by Egger's test (see Supplementary Methods S1).

The P values < 0.05 were considered statistically significant for all the tests apart from the Q statistic, where P values < 0.10 were considered statistically significant. The analysis was carried out using the SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC) version 9.4 and STATA (StataCorp, College Station, TX) version 13 software.

Stable coumarin dose predictive model.—Due to significant differences in coumarin dose and *CYP4F2*3* association for different drugs and ethnic groups, the individual data analysis on the pooled dataset was always reported for each type of drug (acenocoumarol/warfarin) and for each ethnic group.

For each ethnic and drug subgroup, we randomly chose 2/3 of patients as the “derivation cohort” for developing dose-prediction models, whereas the remaining 1/3 of the patients constituted the “validation cohort,” which was used for testing the final selected model. In order to keep a large sample size for prediction model construction, we included covariates that were available in the majority of studies (Table 1): age, BMI, gender, indication for treatment, *CYP4F2*3*, *CYP2C9*2*, **3*, and **5* (for blacks), and *VKORC1* polymorphisms, by using general linear models with log dose of coumarin as dependent variable. To use an additive genetic model, we coded the number of variant alleles at each locus as 0, 1, or 2. Sensitivity analyses were also conducted on the whole cohort of subjects by including further available covariates collected in a smaller number of studies (concomitant drugs, especially amiodarone, and smoking status) to assess their role in stable coumarin dose prediction. The coefficient of determination (R^2) was calculated both for the main prediction model on the “derivation cohort” and for models included in sensitivity analyses. We applied the scores obtained from the main prediction model to the validation dataset and also calculated the R^2 .

For the sake of comparison, we also applied scores obtained from two previously published models for warfarin dose prediction^{13,14} to our validation cohort and converted the scores to units of mg/week. In order to correctly compare our proposed model with each of the two previously published models, R^2 was calculated on the subset of subjects for whom both scores could be calculated on the basis of available data. In order to assess the importance of *CYP4F2*3* on warfarin dose prediction in our data, we also compared dose predictions from our pharmacogenetic model, including *CYP4F2*3* in the whole dataset with that from our model excluding *CYP4F2*3* by using the adjusted R^2 as defined by Darlington (see Supplementary Methods S1).

Gene–gene and gene–drug interactions were investigated by adding an interaction term to the main prediction model fitted on the whole cohort of subjects (for each drug/ethnicity subgroup) in order to have the largest sample size to test for interaction. Moreover, we performed subgroup analyses according to the use or not of specific concomitant drugs, to evaluate whether the change in coumarin dose associated with specific gene poly-morphisms were modified by concomitant drugs.

The assumption of exchangeability for this analysis was briefly discussed in the Supplementary Methods S1. The *P* values < 0.05 were considered statistically significant. The analyses were carried out using SAS version 9.4 software. The SAS code is available as Supplementary Material S1.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Authors

Elisa Danese^{1,†}, Sara Raimondi^{2,†}, Martina Montagnana¹, Angela Tagetti², Taimour Langae³, Paola Borgiani⁴, Cinzia Ciccacci⁴, Antonio J. Carcas^{5,6}, Alberto M. Borobia^{5,6}, Hoi Y. Tong^{5,6}, Cristina Dávila-Fajardo⁷, Mariana Rodrigues Botton⁸, Stephane Bourgeois⁹, Panos Deloukas^{9,10}, Michael D. Caldwell¹¹, Jim K. Burmester¹², Richard L. Berg¹³, Larisa H. Cavallari³, Katarzyna Drozda¹⁴, Min Huang¹⁵, Li-Zi Zhao¹⁵, Han-Jing Cen¹⁶, Rocio Gonzalez-Conejero¹⁷, Vanessa Roldan¹⁷, Yusuke Nakamura¹⁸, Taisei Mushirola¹⁸, Inna Y. Gong¹⁹, Richard B. Kim¹⁹, Keita Hirai²⁰, Kunihiko Itoh²⁰, Carlos Isaza²¹, Leonardo Beltrán^{21,22}, Enrique Jiménez-Varo²³, Marisa Cañadas-Garre²⁴, Alice Giontella², Marianne K. Kringen^{25,26}, Kari Bente Foss Haug²⁷, Hye Sun Gwak²⁸, Kyung Eun Lee²⁹, Pietro Minuz², Ming Ta Michael Lee^{30,31}, Steven A. Lubitz³², Stuart Scott³³, Cristina Mazzaccara^{34,35}, Lucia Sacchetti^{34,35}, Ece Genç³⁶, Mahmut Özer³⁶, Anil Pathare³⁷, Rajagopal Krishnamoorthy³⁸, Andras Paldi³⁹, Virginie Siguret^{40,41}, Marie-Anne Loriot^{42,43}, Vijay Kumar Kutala⁴⁴, Guilherme Suarez-Kurtz⁴⁵, Jamila Perini⁴⁶, Josh C. Denny⁴⁷, Andrea H. Ramirez⁴⁸, Balraj Mittal⁴⁹, Saurabh Singh Rathore⁴⁹, Hersh Sagreiya⁵⁰, Russ Altman⁵⁰, Mohamed Hossam A. Shahin⁵¹, Sherief I. Khalifa⁵², Nita A. Limdi⁵³, Charles Rivers⁵³, Aditi Shendre⁵⁴, Chrisly Dillon⁵³, Ivet M. Suriapranata⁵⁵, Hong-Hao Zhou⁵⁶, Sheng-Lan Tan⁵⁷, Vacis Tatarunas⁵⁸, Vaiva Lesauskaite⁵⁸, Yumao Zhang⁵⁹, Anke H. Maitland-van der Zee^{59,60}, Talitha I. Verhoef⁶¹, Anthonius de Boer⁵⁹, Monica Taljaard⁶², Carlo Federico Zambon⁶³, Vittorio Pengo⁶⁴, Jieying Eunice Zhang⁶⁵, Munir Pirmohamed⁶⁵, Julie A. Johnson^{3,‡}, and Cristiano Fava^{2,‡}

Affiliations

¹Clinical Biochemistry Section, Department of Neurological, Biomedical and Movement Sciences, University of Verona, Verona, Italy; ²General Medicine and Hypertension Unit, Department of Medicine, University of Verona, Verona, Italy; ³Department of Pharmacotherapy and Translational Research, Center for Pharmacogenomics, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, Florida, USA; ⁴Genetics Section, Department of Biomedicine and Prevention, University of Rome "Tor Vergata," Rome, Italy; ⁵Clinical Pharmacology Department, La Paz University Hospital, School of Medicine, IdiPAZ, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ⁶Spanish Clinical Research Network-SCReN, Madrid, Spain; ⁷Department of Clinical Pharmacy, San Cecilio University Hospital, Institute for Biomedical Research, IBS, Granada, Spain; ⁸Departamento de Genética,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁹William Harvey Research Institute, Barts & the London Medical School, Queen Mary University of London, London, UK; ¹⁰Princess Al-Jawhara Al-Brahim Centre of Excellence in Research of Hereditary Disorders (PACER-HD), King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia; ¹¹Center for Hyperbaric Medicine and Tissue Repair, Marshfield Clinic, Marshfield, Wisconsin, USA; ¹²Grants Office, Gundersen Health System, La Crosse, Wisconsin, USA; ¹³Clinical Research Center, Marshfield Clinic Research Foundation, Marshfield, Wisconsin, USA; ¹⁴Department of Pharmacy Practice, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA; ¹⁵School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, China; ¹⁶Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, China; ¹⁷Centro Regional de Hemodonación, Hospital Universitario Morales Meseguer, Universidad de Murcia, Murcia, Spain; ¹⁸Research Group for Pharmacogenomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan; ¹⁹Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada; ²⁰Department of Clinical Pharmacology & Genetics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan; ²¹Faculty of Health Sciences, Laboratory of Medical Genetics, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia; ²²Faculty of Health Sciences, Unidad Central del Valle del Cauca, Valle del Cauca, Colombia; ²³Clinical Laboratory Department, Hospital La Línea, Cádiz, Spain; ²⁴Centre for Public Health, School of Medicine, Dentistry, and Biomedical Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK; ²⁵Department of Pharmacology, Oslo University Hospital, Ullevål, Oslo, Norway; ²⁶Center for Psychopharmacology, Diakonhjemmet Hospital, Oslo, Norway; ²⁷Department of Medical Biochemistry, Oslo University Hospital, Ullevål, Oslo, Norway; ²⁸Division of Life and Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul, Korea; ²⁹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju-si, Korea; ³⁰Genomic Medicine Institute, Geisinger Health System, Danville, Pennsylvania, USA; ³¹National Center for Genome Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan; ³²Cardiac Arrhythmia Service & Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA; ³³Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA; ³⁴CEINGE–Biotecnologie Avanzate s.c.ar.l., Napoli, Italy; ³⁵Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italy; ³⁶Department of Pharmacology, Yeditepe University, Istanbul, Turkey; ³⁷College of Medicine & Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat, Oman; ³⁸INSERM, UMR_S 763, Paris, France; ³⁹Ecole Pratique des Hautes Etudes, UMRS_951, Genethon, Evry, France; ⁴⁰Sorbonne Paris Cité, INSERM, UMR-S-1140, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁴¹Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière, Service d'Hématologie Biologique, Paris, France; ⁴²Sorbonne Paris Cité, INSERM, UMR-S-1147, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁴³Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie UF Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, Paris,

France; ⁴⁴Department of Clinical Pharmacology & Therapeutics, Nizam's Institute of Medical Sciences, Hyderabad, India; ⁴⁵Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴⁶Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University-UEZO, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴⁷Department of Medicine and Department of Biomedical Informatics, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA; ⁴⁸Department of Medicine, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA; ⁴⁹Department of Biotechnology, Babasaheb Bhimrao Ambedkar University, Lucknow, India; ⁵⁰Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA; ⁵¹Department of Pharmacotherapy and Translational Research, Center for Pharmacogenomics, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, Florida, USA; ⁵²College of Pharmacy, Gulf Medical University, Ajman, United Arab Emirates; ⁵³Department of Neurology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA; ⁵⁴Department of Epidemiology, Richard M. Fairbanks School of Public Health, Indiana University Purdue University, Indianapolis, Indiana, USA; ⁵⁵Mochtar Riady Institute for Nanotechnology, Universitas Pelita Harapan, Lippo Karawaci, Tangerang, Banten, Indonesia; ⁵⁶Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Hunan Sheng, China; ⁵⁷Department of Pharmacy, Xiangya Second Hospital, Central South University, Hunan Sheng, China; ⁵⁸Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania; ⁵⁹Division of Pharmacoepidemiology and Clinical Pharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands; ⁶⁰Department of Respiratory Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ⁶¹Department of Applied Health Research, University College London, London, UK; ⁶²Clinica Epidemiology Program and Department of Epidemiology and Community Medicine, Ottawa Hospital Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada; ⁶³Department of Medicine-DIMED, University of Padua, Padua, Italy; ⁶⁴Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padua, Padua, Italy; ⁶⁵Wolfson Centre for Personalised Medicine, Department of Molecular and Clinical Pharmacology, University of Liverpool, Liverpool, UK.

FUNDING

P.D. is supported by British Heart Foundation (BHF) grant RG/14/5/30893; this study forms part of the research themes contributing to the translational research portfolio of Barts Cardiovascular Biomedical Research Centre, which is funded by the National Institute for Health Research (NIHR). C.F. was supported by a grant of the CARIVERONA foundation for the project "towards a tailored interpretation of the individual variability of the response to the drug".

References

1. Lim GB. Milestone 2: warfarin: from rat poison to clinical use. *Nat Rev Cardiol.* 10.1038/nrcardio.2017.172. [e-pub ahead of print].
2. Johnson JA et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for pharmacogenetics-guided war-farin dosing: 2017 update. *Clin. Pharmacol. Ther* 102, 397–404 (2017). [PubMed: 28198005]

3. Stergiopoulos K & Brown DL Genotype-guided vs clinical dosing of warfarin and its analogues: meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Intern. Med* 174, 1330–1338 (2014). [PubMed: 24935087]
4. Pirmohamed M et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N. Engl. J. Med* 369, 2294–2303 (2013). [PubMed: 24251363]
5. Kimmel SE et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N. Engl. J. Med* 369, 2283–2293 (2013). [PubMed: 24251361]
6. Gage BF et al. Effect of genotype-guided warfarin dosing on clinical events and anticoagulation control among patients undergoing hip or knee arthroplasty. *JAMA* 318, 1115 (2017). [PubMed: 28973620]
7. Li X et al. Clinical benefits of pharmacogenetic algorithm-based warfarin dosing: meta-analysis of randomized controlled trials. *Thromb. Res* 135, 621–629 (2015). [PubMed: 25628141]
8. Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Bonfanti C & Mannucci PM Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost* 12, 1480–1487 (2014). [PubMed: 25040440]
9. Shi C et al. Pharmacogenetics-based versus conventional dosing of warfarin: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 10, e0144511 (2015). [PubMed: 26672604]
10. Belley-Cote EP et al. Genotype-guided versus standard vitamin K antagonist dosing algorithms in patients initiating anticoagulation. A systematic review and meta-analysis. *Thromb. Haemost* 114, 768–777 (2015). [PubMed: 26158747]
11. Wang Z-Q et al. Pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm decreases time to stable anticoagulation and the risk of major hemorrhage. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 65, 364–370 (2015). [PubMed: 25551322]
12. Danese E et al. Impact of the CYP4F2 p.V433M polymorphism on coumarin dose requirement: systematic review and meta-analysis. *Clin. Pharmacol. Ther* 92, 746–756 (2012). [PubMed: 23132553]
13. Gage B et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther* 84, 326–331 (2008). [PubMed: 18305455]
14. Consortium IWP et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N. Engl. J. Med* 360, 753–764 (2009). [PubMed: 19228618]
15. Borobia AM et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One* 7, e41360 (2012). [PubMed: 22911785]
16. Rathore SS et al. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS One* 7, e37844 (2012). [PubMed: 22629463]
17. Caldwell MD et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111, 4106–4112 (2008). [PubMed: 18250228]
18. Borgiani P et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics* 10, 261–266 (2009). [PubMed: 19207028]
19. Pérez-Andreu V et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood* 113, 4977–4979 (2009). [PubMed: 19270263]
20. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E & Suarez-Kurtz G Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. *Clin. Pharmacol. Ther* 87, 417–420 (2010). [PubMed: 20182420]
21. Sagreiya H et al. Extending and evaluating a warfarin dosing algorithm that includes CYP4F2 and pooled rare variants of CYP2C9. *Pharmacogenet. Genomics* 20, 407–413 (2010). [PubMed: 20442691]
22. Shahin MHA et al. Genetic and nongenetic factors associated with warfarin dose requirements in Egyptian patients. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 130–135 (2011). [PubMed: 21228733]
23. Suriapranata IM et al. Genetic factors associated with patient-specific warfarin dose in ethnic Indonesians. *BMC Med. Genet* 12, 80 (2011). [PubMed: 21639946]
24. Wells PS et al. A regression model to predict warfarin dose from clinical variables and polymorphisms in CYP2C9, CYP4F2, and VKORC1: derivation in a sample with predominantly a history of venous thromboembolism. *Thromb. Res* 125, e259–e264 (2010). [PubMed: 20421126]

25. Zambon C-F et al. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics* 12, 15–25 (2011). [PubMed: 21174619]
26. Zhang JE et al. Effects of CYP4F2 genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 781–789 (2009). [PubMed: 19741565]
27. Lee MTM et al. Genetic determinants of warfarin dosing in the Han-Chinese population. *Pharmacogenomics* 10, 1905–1913 (2009). [PubMed: 19958090]
28. Botton MR, Bandinelli E, Rohde LEP, Amon LC & Hutz MH Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *Br. J. Clin. Pharmacol* 72, 442–450 (2011). [PubMed: 21320153]
29. Cavallari LH et al. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther* 87, 459–464 (2010). [PubMed: 20072124]
30. Cen H-J et al. CYP4F2 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br. J. Clin. Pharmacol* 70, 234–240 (2010). [PubMed: 20653676]
31. Cha P-C et al. Genome-wide association study identifies genetic determinants of warfarin responsiveness for Japanese. *Hum. Mol. Genet* 19, 4735–4744 (2010). [PubMed: 20833655]
32. Gong IY et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy. *Blood* 118, 3163–3171 (2011). [PubMed: 21725053]
33. Kringen MK et al. Genetic variation of VKORC1 and CYP4F2 genes related to warfarin maintenance dose in patients with myocardial infarction. *J. Biomed. Biotechnol* 2011, 739751 (2011). [PubMed: 21127708]
34. Lubitz SA et al. Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. *J. Thromb. Haemost* 8, 1018–1026 (2010). [PubMed: 20128861]
35. Pautas E et al. Genetic factors (VKORC1, CYP2C9, EPHX1, and CYP4F2) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clin. Pharmacol. Ther* 87, 57–64 (2010). [PubMed: 19794411]
36. Aquilante C et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin. Pharmacol. Ther* 79, 291–302 (2006). [PubMed: 16580898]
37. Pathare AV et al. Warfarin pharmacogenetics: polymorphisms of the CYP2C9, CYP4F2, and VKORC1 loci in a genetically admixed Omani population. *Hum. Biol* 84, 67–77 (2012). [PubMed: 22452429]
38. Pavani A et al. Optimization of warfarin dose by population-specific pharmacogenomic algorithm. *Pharmacogenomics J.* 12, 306–311 (2012). [PubMed: 21358752]
39. Ramirez AH et al. Predicting warfarin dosage in European-Americans and African-Americans using DNA samples linked to an electronic health record. *Pharmacogenomics* 13, 407–418 (2012). [PubMed: 22329724]
40. Shendre A et al. Race-specific influence of CYP4F2 on dose and risk of hemorrhage among warfarin users. *Pharmacotherapy* 36, 263–272 (2016). [PubMed: 26877068]
41. Tan S-LL et al. Cytochrome P450 oxidoreductase genetic polymorphisms A503V and rs2868177 do not significantly affect warfarin stable dosage in Han-Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 69, 1769–1775 (2013). [PubMed: 23949431]
42. Tatarunas V et al. The effect of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 polymorphism and of clinical factors on warfarin dosage during initiation and long-term treatment after heart valve surgery. *J. Thromb. Thrombolysis* 37, 177–185 (2014). [PubMed: 23677510]
43. Tong HY et al. A new pharmacogenetic algorithm to predict the most appropriate dosage of acenocoumarol for stable anticoagulation in a mixed Spanish population. *PLoS One* 11, e0150456 (2016). [PubMed: 26977927]
44. Van Schie RMF, Aoussar A, van der Meer FJM, Boer A. de & Maitland-van der Zee AH Evaluation of the effects of single-nucleotide polymorphisms in CYP3A4 and CYP4F2 on stable phenprocoumon and acenocoumarol maintenance doses. *J. Thromb. Haemost* 11, 1200–1203 (2013). [PubMed: 23510058]

45. Bourgeois S et al. A multi-factorial analysis of response to warfarin in a UK prospective cohort. *Genome Med.* 8, 2 (2016). [PubMed: 26739746]
46. Cerezo-Manchado JJ et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb. Haemost* 109, 146–153 (2013). [PubMed: 23196355]
47. Hirai K et al. Plasma vitamin K concentrations depend on CYP4F2 polymorphism and influence on anticoagulation in Japanese patients with warfarin therapy. *Thromb. Res* 135, 861–866 (2015). [PubMed: 25747538]
48. Isaza CA et al. Factores genéticos y ambientales asociados con la respuesta a warfarina en pacientes colombianos. *Biomedica* 30, 410–420 (2010). [PubMed: 21713343]
49. Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Garcés-Robles V, Gutiérrez-Pimentel MJ & Calleja-Hernández MÁ Extrapolation of acenocoumarol pharmacogenetic algorithms. *Vascul. Pharmacol* 74, 151–157 (2015). [PubMed: 26122664]
50. Lee K-E et al. Effects of CYP4F2 gene polymorphisms on warfarin clearance and sensitivity in Korean patients with mechanical cardiac valves. *Ther. Drug Monit.* 34, 275–282 (2012). [PubMed: 22549502]
51. Mazzaccara C et al. Warfarin anticoagulant therapy: a Southern Italy pharmacogenetics-based dosing model. *PLoS One* 8, e71505 (2013). [PubMed: 23990957]
52. Özer M et al. Impact of genetic factors (CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2) on warfarin dose requirement in the Turkish population. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol* 112, 209–214 (2013). [PubMed: 23061746]
53. Zhang JE et al. Effect of genetic variability in the CYP4F2, CYP4F11, and CYP4F12 genes on liver mRNA levels and warfarin response. *Front. Pharmacol* 8, 323 (2017). [PubMed: 28620303]
54. Fava C, Ricci M, Melander O & Minuz P Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: a sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 98, 75–85 (2012). [PubMed: 22173545]
55. Mega JL et al. Genetics and the clinical response to warfarin and edoxaban: findings from the randomised, double-blind ENGAGE AF-TIMI 48 trial. *Lancet (London, England)* 385, 2280–2287 (2015).
56. Pengo V et al. A randomized trial of pharmacogenetic warfarin dosing in naïve patients with non-valvular atrial fibrillation. *PLoS One* 10, e0145318 (2015). [PubMed: 26710337]
57. Cerezo-Manchado JJ et al. Genotype-guided therapy improves initial acenocoumarol dosing: results from a prospective randomised study. *Thromb. Haemost* 115, 117–125 (2016). [PubMed: 26538428]

Study Highlights

WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

- Coumarin drugs have a narrow therapeutic index, but single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cytochrome P450 (*CYP2C9*) and *VKORC1* genes may help in predicting the dose.

WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

- Do genetic algorithms, including the *CYP4F2*3* SNP, perform better than old ones in predicting mean coumarin dose?

WHAT DOES THIS STUDY ADD TO OUR KNOWLEDGE?

- In this single-patient meta-analysis, we confirm that *CYP4F2*3* influences mean coumarin dose especially in women, in patients taking acenocoumarol, and in white patients but with a low effect size.

HOW MIGHT THIS CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY OR TRANSLATIONAL SCIENCE?

- New pharmacogenetic equations potentially useful for clinical practice have been derived for different ethnic groups.

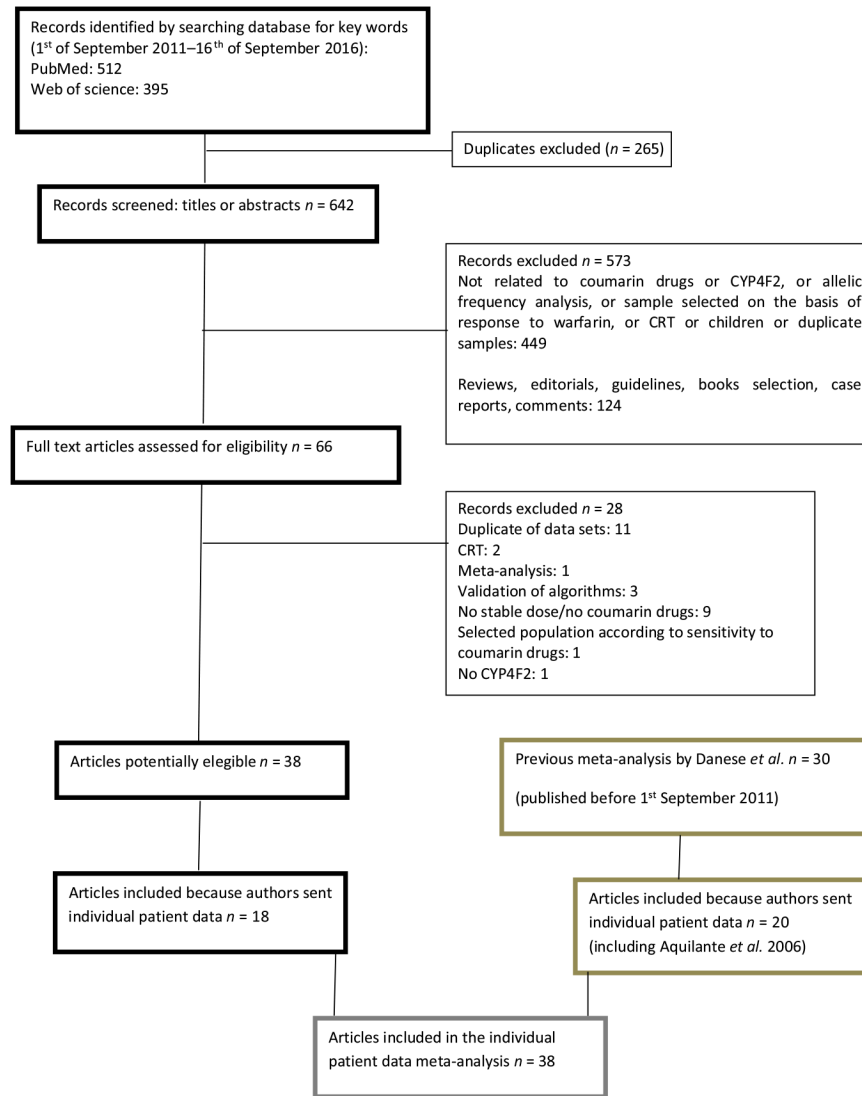


Figure 1. Flow diagram. CRT, controlled randomized trial; *CYP4F2*, cytochrome P450 F2.

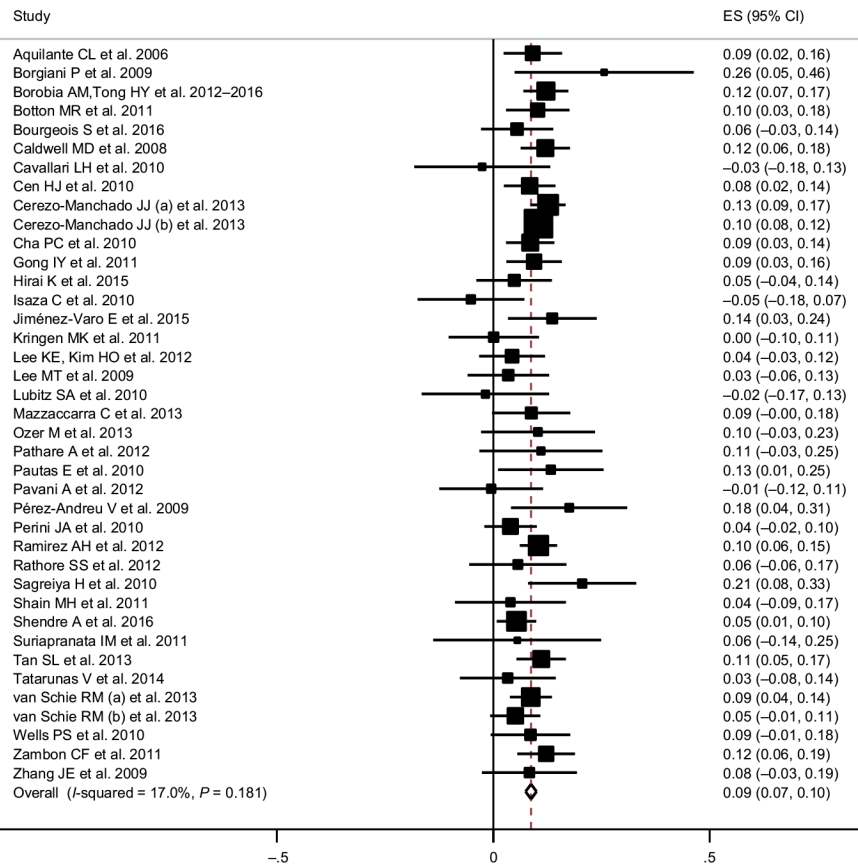


Figure 2. Forest plot for the difference in logarithm of stable coumarin dose* for subjects with cytochrome P450 (*CYP*)*4F2* polymorphism (CT + TT) compared with subjects with (*CYP*)*4F2* wild-type (CC), according to dominant model.

CI=Confidence Intervals; ES=Estimate

* exp(ES) gives the relative percentage difference as weekly dose in mg

Table 1

Descriptive characteristics of studies included in the analysis

First author (ref)	PY	Country	Ethnicity	Subjects, n	Men (%)	Age, years (mean ± SD)	Drug	INR target	Gene polymorphisms	Available confounders ^a
Aquilante ³⁶	2006	Florida (USA)	Whites (93%) Blacks (7%)	344	300 (87%)	69 ± 11	Warfarin	2.5–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment
Borgiani ¹⁸	2009	Italy	Whites	141	75 (53%)	69 ± 12	Warfarin	2.0–4.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, indication for treatment
Borobial ¹⁵ Tong ⁴³	2012–2016	Spain	Whites (Spanish)	679	345 (51%)	68 ± 13	Acenocoumarol	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Botton ²⁸	2011	Brazil	Whites	279	155 (57%)	63 ± 14	Warfarin	1.8–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, BMI, gender, smoking, other drugs
Bourgeois ⁴⁵	2016	UK	Whites	217	119 (55%)	71 ± 11	Warfarin	2.0–4.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Caldwell ¹⁷	2008	Wisconsin (USA)	Whites	429	252 (59%)	69 ± 11	Warfarin	2.0–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
Cavallari ²⁹	2010	Illinois (USA)	Blacks	208	57 (27%)	56 ± 16	Warfarin	2.0–4.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*5, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Cei ³⁰	2010	China	Asians	221	103 (47%)	45 ± 12	Warfarin	1.5–3.0	CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, other drugs
Cerezo-Manchado (a) ⁴⁶	2013	Spain	Whites	943	459 (49%)	75 ± 9	Acenocoumarol	2.0–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, indication for treatment, other drugs
Cerezo-Manchado (b) ⁴⁶	2013	Spain	Whites	3,882	1,916 (49%)	74 ± 10	Acenocoumarol	2.0–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, gender, indication for treatment, other drugs
Cha ³¹	2010	Japan	Asians	440	293 (77%)	68 ± 11	Warfarin	1.5–3.0	CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
Gong ³²	2011	UK	Whites (95%) Blacks (3%) Asians (2%)	167	96 (57%)	60 ± 18	Warfarin	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, indication for treatment
Hirai ⁴⁷	2015	Japan	Asians	217	143 (66%)	68 ± 10	Warfarin	1.5–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, indication for treatment
Isaza ⁴⁸	2010	Colombia	Hispanic	145	72 (50%)	55 ± 15	Warfarin	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, BMI, gender, indication for treatment
Jimenez-Vare ⁴⁹	2014–2015	Spain	Whites	162	89 (55%)	73 ± 9	Acenocoumarol	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Kringen ³³	2011	Norway	Whites	105	87 (83%)	60 ± 9	Warfarin	1.9–3.6	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, other drugs
Lee ⁵⁰	2012	Korea	Asians	188	62 (33%)	59 ± 10	Warfarin	2.0–3.0	CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, other drugs
Lee ²⁷	2009	China	Asians	233	130 (56%)	63 ± 13	Warfarin	1.7–3.0	CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
Lubitz ³⁴	2010	New York (USA)	Whites (68%) Blacks (20%) Asians (12%)	155	97 (63%)	69 ± 14	Warfarin	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*5, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Mazzaccara ⁵¹	2013	Italy	Whites	256	142 (55%)	67 ± 11	Warfarin	1.6–3.9	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
Ozer ⁵²	2013	Turchia	Whites	107	53 (50%)	54 ± 14	Warfarin	1.5–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment
Pathare ³⁷	2012	Oman	Asians	188	88 (47%)	51 ± 17	Warfarin	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Pautas ³⁵	2010	France	Whites	272	65 (24%)	87 ± 6	Warfarin	2.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, gender, other drugs
Pavani ³⁸	2012	India	Indians	207	108 (52%)	40 ± 13	Warfarin	2.0–3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender
Perez-Andreu ¹⁹	2009	Spain	Whites	100	100 (100%)	65 ± 6	Acenocoumarol	2.0–3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age

First author (ref)	PY	Country	Ethnicity	Subjects, n	Men (%)	Age, years (mean ± SD)	Drug	INR target	Gene polymorphisms	Available confounders ^a
Perini ²⁰	2010	Brazil	Whites (50%) Brown (30%) Blacks (20%)	390	186 (48%)	54 ± 15	Warfarin	2.0-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*5, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Ramirez ³⁹	2012	Tennessee (USA)	Whites	1,029	586 (57%)	65 ± 15	Warfarin	1.6-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Rathore ¹⁶	2012	India	Indians	217	145 (67%)	39 ± 12	Acenocoumarol	2.0-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2 ^b	Age, BMI, gender, smoking
Sagraya ²¹	2010	California (USA)	Whites (75%) Asians (17%) Blacks (8%)	101	58 (57%)	64 ± 15	Warfarin	1.8-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Shah ²²	2011	Egypt	Egyptians	188	84 (44%)	48 ± 15	Warfarin	1.5-3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment
Shendire ⁴⁰	2016	Alabama (USA)	Whites (58%) Blacks (41%) Asians (1%)	1,169	610 (52%)	61 ± 16	Warfarin	1.8-3.2	CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*5, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Suripranant ²³	2011	Indonesia	Asians	85	48 (56%)	57 ± 11	Warfarin	1.5-2.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Tan ⁴¹	2013	China	Asians	317	95 (30%)	45 ± 10	Warfarin	1.8-3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender
Tatarunas ⁴²	2014	Lithuania	Whites	189	118 (62%)	65 ± 11	Warfarin	2.0-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, other drugs
van Schie (a) ⁴⁴	2013	Netherlands	Whites	568	328 (58%)	70 ± 11	Other (phenprocoumon)	2.0-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
van Schie (b) ⁴⁴	2013	Netherlands	Whites	397	217 (55%)	73 ± 9	Acenocoumarol	2.0-3.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, indication for treatment, other drugs
Weijl ²⁴	2010	Canada	Whites	246	136 (55%)	61 ± 14	Warfarin	2.0-3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs
Zamboni ²⁵	2011	Italy	Whites	371	231 (62%)	73 ± 9	Warfarin	2.5	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment
Zhang ²⁶	2009	UK	Whites	202	120 (59%)	66 ± 14	Warfarin	2.0-3.0	CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, CYP4F2	Age, BMI, gender, smoking, indication for treatment, other drugs

BMI, body mass index; CYP, cytochrome P450; INR, International Normalized Ratio; PY, publication year.

^aCovariates with < 20% of missing data are here indicated and used in the multivariate analysis.

^bCYP2F4 not in Hardy-Weinberg equilibrium.

Subgroup analyses of association studies of the CYP4F2 polymorphism on coumarin dose requirements

Table 2

Variable	Subgroup (N studies)	Difference ^a (95% CI)	I ² (Q test F value)	Meta regression P value
Ethnicity	Whites (26)	0.10 (0.08–0.11)	15% (0.25)	0.002
	Asians (10)	0.08 (0.05–0.11)	0% (0.85)	0.02
	Blacks (5)	0.05 (–0.04; 0.14)	21% (0.28)	0.36
	Others (5) ^b	0.01 (–0.05; 0.06)	0% (0.72)	Reference
Drug	Acenocoumarol (7)	0.11 (0.09–0.13)	13% (0.33)	0.03
	Warfarin (31)	0.08 (0.06–0.09)	9% (0.33)	
Sex	Males (39)	0.07 (0.06–0.09)	16% (0.20)	0.03
	Females (38)	0.10 (0.08–0.12)	19% (0.16)	
INR target	< 2.5 (11)	0.08 (0.05–0.11)	0% (0.79)	Reference
	2.5 (23)	0.09 (0.07–0.11)	22% (0.17)	0.42
	> 2.5 (18)	0.08 (0.06–0.10)	0% (0.49)	0.93
Smoking	No (21)	0.09 (0.07–0.11)	0% (0.68)	0.74
	Yes (12)	0.07 (–0.02; 0.15)	33% (0.12)	
Other drugs considered	No (7)	0.08 (0.03–0.12)	47% (0.08)	0.72
	Yes (32)	0.09 (0.08–0.10)	10% (0.31)	
Hardy-Weinberg equilibrium	No (6)	0.08 (0.04–0.12)	53% (0.06)	0.92
	Yes (33)	0.09 (0.07–0.10)	9% (0.33)	
Quality score	< 5	0.08 (0.06–0.10)	29% (0.11)	0.46
	≥ 5	0.09 (0.08–0.11)	6% (0.39)	
CYP2C9	CYP2C9 *1*1	0.08 (0.07–0.10)	18% (0.18)	0.73
	CYP2C9 *1*2/*1*3/*2*2/*2*3/*3*3	0.09 (0.06–0.12)	25% (0.10)	
VKORC1	VKORC1 GG	0.08 (0.06–0.10)	4% (0.40)	0.13
	VKORC1 AA/AG	0.10 (0.08–0.11)	10% (0.30)	

Data in bold are significant at $P < 0.05$.

CI, confidence interval; CYP, cytochrome P450; INR, International Normalized Ratio.

^a Difference in logarithm of stable coumarin dose of subjects with CYP4F2 polymorphism (CT + TT) compared with subjects with CYP4F2 wild-type (CC), according to dominant model.

^bIncludes Indian, Egyptian, brown, and Hispanic.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 3 Predictive model for logarithm of stable coumarin dose according to patients' clinical and genetic characteristics

WHITES								
Variable	Acenocoumarol			Warfarin				
	Parameter estimate (95% CI)	P value	R ² test (N= 2,744)	R ² validation (N= 1,410)	Parameter estimate (95% CI)	P value	R ² latest (N= 3,016)	R ² validation (N= 1,532)
Intercept	4.069 (3.883; 4.256)	< 0.0001	0.33	0.28	3.981 (3.887; 4.075)	< 0.0001	0.51	0.52
Age ^a	-0.014 (-0.015; -0.012)	< 0.0001			-0.009 (-0.010; -0.008)	< 0.0001		
BMI ^a	-0.002 (-0.006; 0.002)	0.28			0.010 (0.008; 0.012)	< 0.0001		
Male gender	0.014 (-0.024; 0.052)	0.47			0.123 (0.098; 0.148)	< 0.0001		
Indication for treatment ^b	0.000 (-0.042; 0.042)	0.98			-0.043 (-0.069; -0.017)	0.001		
CYP2C9*2 1-allele	-0.190 (-0.232; -0.147)	< 0.0001			-0.231 (-0.261; -0.202)	< 0.0001		
CYP2C9*2 2-alleles	-0.359 (-0.484; -0.234)	< 0.0001			-0.513 (-0.600; -0.426)	< 0.0001		
CYP2C9*3 1-allele	-0.394 (-0.446; -0.342)	< 0.0001			-0.387 (-0.425; -0.350)	< 0.0001		
CYP2C9*3 2-alleles	-1.214 (-1.522; -0.907)	< 0.0001			-1.316 (-1.502; -1.131)	< 0.0001		
VKORC1 AG	-0.291 (-0.332; -0.249)	< 0.0001			-0.266 (-0.292; -0.240)	< 0.0001		
VKORC1 AA	-0.762 (-0.816; -0.708)	< 0.0001			-0.666 (-0.704; -0.629)	< 0.0001		
CYP4F2 CT	0.018 (-0.022; 0.058)	0.39			0.073 (0.047; 0.098)	< 0.0001		
CYP4F2 TT	0.100 (0.041; 0.159)	0.0009			0.191 (0.147; 0.235)	< 0.0001		
ASIANS								
Variable	Acenocoumarol			Warfarin				
	Parameter estimate	P value	R ² test (N=0)	R ² validation (N=0)	Parameter estimate	P value	R ² test (N= 292)	R ² validation (N = 146)
Intercept	-	-	-	-	3.484 (3.112; 3.855)	< 0.0001	0.45	0.42
Age ^a	-	-			-0.005 (-0.008; -0.001)	0.02		
BMI ^a	-	-			0.014 (0.004; 0.023)	0.004		
Male gender	-	-			0.058 (-0.050; 0.167)	0.29		
Indication for treatment ^b	-	-			-0.027 (-0.139; 0.084)	0.63		
CYP2C9*2 1-allele	-	-			-0.114 (-0.351; 0.124)	0.35		

WHITES								
Acenocoumarol			Warfarin					
Variable	Parameter estimate (95% CI)	P value	R ² test (N = 2,744)	R ² validation (N = 1,410)	Parameter estimate (95% CI)	P value	R ² latest (N = 3,016)	R ² validation (N = 1,552)
CYP2C9*2 2-alleles	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C9*3 1-allele	-	-	-	-	-0.224 (-0.428; -0.020)	0.03	-	-
CYP2C9*3 2-alleles	-	-	-	-	-1.065 (-1.717; -0.412)	0.002	-	-
VKORC1 AG	-	-	-	-	-0.422 (-0.574; -0.271)	< .0001	-	-
VKORC1 AA	-	-	-	-	-0.827 (-0.975; -0.679)	< .0001	-	-
CYP4F2 CT	-	-	-	-	0.117 (0.003; 0.231)	0.04	-	-
CYP4F2 TT	-	-	-	-	0.124 (-0.075; 0.324)	0.22	-	-
BLACKS								
Acenocoumarol			Warfarin					
Variable	Parameter estimate	P value	R ² test (N=0)	R ² validation (N = 0)	Parameter estimate	P value	R ² test (N = 534)	R ² validation (N = 288)
Intercept	-	-	-	-	3.875 (3.692; 4.061)	< 0.0001	0.30	0.22
Age ^a	-	-	-	-	-0.009 (-0.011; -0.006)	< 0.0001	-	-
BMI ^a	-	-	-	-	0.010 (0.007; 0.015)	< 0.0001	-	-
Male gender	-	-	-	-	0.152 (0.086; 0.219)	< 0.0001	-	-
Indication for treatment ^b	-	-	-	-	-0.090 (-0.160; -0.0183)	0.01	-	-
CYP2C9*2 1-allele	-	-	-	-	-0.007 (-0.149; 0.133)	0.93	-	-
CYP2C9*2 2-alleles	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C9*3 1-allele	-	-	-	-	-0.469 (-0.666; -0.270)	< 0.0001	-	-
CYP2C9*3 2-alleles	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C9*5 1-allele	-	-	-	-	-0.436 (-0.736; -0.137)	0.005	-	-
CYP2C9*5 2-alleles	-	-	-	-	-	-	-	-
VKORC1 AG	-	-	-	-	-0.284 (-0.585; -0.020)	0.07	-	-
VKORC1 AA	-	-	-	-	-0.281 (-0.588; -0.020)	< 0.0001	-	-
CYP4F2 CT	-	-	-	-	-0.0382 (-0.124; 0.050)	0.40	-	-
CYP4F2 TT	-	-	-	-	0.300 (-0.068; 0.664)	0.11	-	-

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Statistical test for model fit (R^2) is reported both for the test and validation cohorts. Due to significant heterogeneity, separate models are reported for different ethnic groups and drugs. BMI, body mass index; CI, confidence interval; CYP, cytochrome P450.

^a Estimate for 1 unit increase.

^b Estimate for the following indication for treatment: fibrillation/flutter, cardiomyopathy/left ventricular dilation, postorthopedic.

Table 4

Beta coefficients (P values) for single genes and gene-gene interaction

Ethnicity	Drug	N subjects (N studies)	CYP4F2	CYP2C9	VKORC1	CYP4F2*CYP2C9	CYP4F2*VKORC1	CYP2C9*VKORC1
Whites	Acenocoumarol	4,154 (5)	0.08 (0.0002)	-0.22 (< 0.0001)	-0.40 (< 0.0001)	-0.02 (0.51)	-0.03 (0.21)	-0.01 (0.79)
	Warfarin	4,548 (15)	0.08 (0.0001)	-0.30 (< 0.0001)	-0.38 (< 0.0001)	-0.001 (0.96)	0.02 (0.37)	-0.01 (0.55)
Asians	Acenocoumarol	0(0)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Blacks	Warfarin	438 (8)	0.10 (0.34)	-0.26 (0.05)	-0.46 (< 0.0001)	0.12 (0.36)	-0.08 (0.48)	-0.004 (0.98)
	Acenocoumarol	0(0)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Others	Warfarin	815 (5)	0.04 (0.30)	-0.20 (0.0004)	-0.27 (< 0.0001)	0.004 (0.97)	-0.02 (0.82)	0.02 (0.83)
	Acenocoumarol	0(0)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
All	Warfarin	701 (7)	-0.08 (0.13)	-0.19 (0.003)	-0.27 (< 0.0001)	0.07 (0.31)	0.09 (0.13)	-0.05 (0.48)
	All	11,435 (29)	0.07 (< 0.0001)	-0.24 (< 0.0001)	-0.37 (< 0.0001)	0.02 (0.21)	0.02 (0.23)	-0.02 (0.12)

Data in bold are significant at P < 0.05.

Ethnicity-specific and drug-specific models are adjusted by study, age, gender, body mass index, and indication for treatment. The final model is also adjusted by ethnicity and drug. For each gene, the reference category is the gene polymorphism according to the dominant model (heterozygous + variant homozygous vs. wt). For the analysis on blacks, CYP2C9 included, beyond *2 and *3, also *5 polymorphism. CYP, cytochrome P450; NE, not estimated.



Article

Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithm versus Usual Care in Patients with Venous Thromboembolism: A Randomised Clinical Trial

Hoi Yan Tong ^{1,†}, Alberto M. Borobia ^{1,2,*}, Manuel Quintana-Díaz ³, Sara Fabra ³, Manuel González-Viñolis ³, Carmen Fernández-Capitán ⁴, María A. Rodríguez-Dávila ⁴, Alicia Lorenzo ⁴, Ana María López-Parra ⁵, Nuria Ruiz-Giménez ⁶, Francisco Abad-Santos ⁷, Carmen Suarez ⁶, Olga Madridano ⁸, Jorge Francisco Gómez-Cerezo ⁸, Pilar Llamas ⁹, Carlos Baeza-Richer ⁵, Eduardo Arroyo-Pardo ⁵, Antonio J. Carcas ^{1,2,*} and The PGX-ACE Spanish Investigators Group [‡]



Citation: Tong, H.Y.; Borobia, A.M.; Quintana-Díaz, M.; Fabra, S.; González-Viñolis, M.; Fernández-Capitán, C.; Rodríguez-Dávila, M.A.; Lorenzo, A.; López-Parra, A.M.; Ruiz-Giménez, N.; et al. Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithm versus Usual Care in Patients with Venous Thromboembolism: A Randomised Clinical Trial. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2949. <https://doi.org/10.3390/jcm10132949>

Academic Editor: Rainer H. Böger

Received: 5 May 2021

Accepted: 28 June 2021

Published: 30 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Clinical Pharmacology Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain; dochoiy29@gmail.com
 - ² Pharmacology Department, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain
 - ³ General Emergency Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain; mquintanadiaz@gmail.com (M.Q.-D.); sarafabra@yahoo.com (S.F.); mglezvinolis@gmail.com (M.G.-V.)
 - ⁴ Internal Medicine Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain; mfcapitan@salud.madrid.org (C.F.-C.); marodavila@ono.com (M.A.R.-D.); alicia.loher@gmail.com (A.L.)
 - ⁵ Laboratory of Population and Forensic Genetics, Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; amlopez236@gmail.com (A.M.L.-P.); cbaezaricher@med.ucm.es (C.B.-R.); earroyop@med.ucm.es (E.A.-P.)
 - ⁶ Department of Internal Medicine, University Hospital La Princesa, 28006 Madrid, Spain; airunruizg@hotmail.com (N.R.-G.); mcarmen.suarez@uam.es (C.S.)
 - ⁷ Clinical Pharmacology Department, University Hospital La Princesa, Teófilo Hernando Institute, Autonomous University of Madrid (UAM), Health Research Institute La Princesa (IIS-IP), 28006 Madrid, Spain; francisco.abad@uam.es
 - ⁸ Department of Internal Medicine, University Hospital Infanta Sofía, 28702 Madrid, Spain; olgamadridano@hotmail.com (O.M.); jfrancisco.gomez@salud.madrid.org (J.F.G.-C.)
 - ⁹ Department of Internal Medicine, University Hospital Jiménez Díaz Foundation, 28040 Madrid, Spain; pilar.llamas@uam.es
- * Correspondence: alberto.borobia@salud.madrid.org (A.M.B.); antonio.carcas@uam.es (A.J.C.); Tel.: +34-912-071-466 (A.M.B.); +34-914-975-372 (A.J.C.)
- † Equal contribution.
- ‡ Membership of the PGX-ACE Investigators Group is listed in Appendix A.

Abstract: Patients with venous thromboembolism (VTE) require immediate treatment with anticoagulants such as acenocoumarol. This multicentre randomised clinical trial evaluated the effectiveness of a dosing pharmacogenetic algorithm versus a standard-of-care dose adjustment at the beginning of acenocoumarol treatment. We included 144 patients with VTE. On the day of recruitment, a blood sample was obtained for genotyping (*CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *VKORC1*, *CYP4F2*, *APOE*). Dose adjustment was performed on day 3 or 4 after the start of treatment according to the assigned group and the follow-up was at 12 weeks. The principal variable was the percentage of patients with an international normalised ratio (INR) within the therapeutic range on day 7. Thirty-four (47.2%) patients had an INR within the therapeutic range at day 7 after the start of treatment in the genotype-guided group compared with 14 (21.9%) in the control group ($p = 0.0023$). There were no significant differences in the time to achieve a stable INR, the number of INRs within the range in the first 6 weeks and at the end of study. Our results suggest the use of a pharmacogenetic algorithm for patients with VTE could be useful in achieving target INR control in the first days of treatment.

Keywords: pharmacogenetics; acenocoumarol; venous thromboembolism; clinical trial

1. Introduction

Over the years, vitamin K antagonists (VKAs) have shown high efficiency in preventing thromboembolic complications, mainly in patients with atrial fibrillation and cardiac valve replacement; however, VKAs are also employed for the acute-phase treatment of patients with venous thromboembolism (VTE), both in pulmonary thromboembolism (PTE) and in deep vein thrombosis (DVT) [1,2].

VKAs such as warfarin and acenocoumarol are characterised by their narrow therapeutic range and high inter-individual variability, which make it difficult for them to achieve and maintain international normalised ratio (INR) values within the recommended target range. Numerous studies have been conducted to find factors that could explain this variability and have shown that certain demographic data and genetic information, mainly allelic variants of *CYP2C9* (rs1799853 and rs1057910) and *VKORC1* (rs9923231), can affect the dose required to achieve a stable INR within the therapeutic range for warfarin and acenocoumarol, and *CYP4F2* (rs2108622) can affect the dose required for acenocoumarol. Due to the evidence from these studies, the US Food and Drug Administration updated the warfarin drug label information on dosing recommendations in 2007, with consideration for pharmacogenetic polymorphism information [3]. Among the coumarins, warfarin is the most widely known VKA and is employed in numerous countries; acenocoumarol, however, is the main coumarin employed in many European countries. The drug labels for acenocoumarol in Europe only provide general pharmacogenetic information but no specific recommendations for dosing.

Several algorithms have been designed to individualise warfarin and acenocoumarol doses, taking into account demographic, clinical and pharmacogenetic factors. In 2005, Sconce et al. published the first warfarin dosing algorithm, which included age, height and *CYP2C9* and *VKORC1* genotype, an algorithm that could explain nearly 55% of the variability in the drug dosage [4]. Since then, other algorithms have been published [5–7], with a number of algorithms for acenocoumarol, which can predict 40–60% of the variability in the dosage of this drug [8–14].

Clinical trials to prove the utility of the pharmacogenetics in this setting were conducted after the algorithms were developed, with several trials on warfarin, comparing genotype-guided dosing versus conventional dosing and versus a clinical algorithm; however, the results have been inconsistent [15–23]. A number of meta-analyses have been published showing that genotype-guided dosing improves the percentage of time within the therapeutic INR range [24–26], although the usefulness of the pharmacogenetics in reducing bleeding complications is a subject of debate [24,26–28]. To date, there have been only two published clinical trials on acenocoumarol evaluating two different pharmacogenetic algorithms, with conflicting results [22,23], and a few meta-analyses within the context of studies assessing the effect of including genetic variables in the dosing of coumarins [25,28–30]. Most of these studies (with both warfarin and acenocoumarol) included a mixed population. Differentiating patients with atrial fibrillation from those with VTE is important, given that the latter group requires proper anticoagulation very soon after the diagnosis to prevent the onset of possible complications (both early and late), such as re-thrombosis, post-thrombotic syndrome and pulmonary hypertension [31]. Our data [14] show that patients with VTE are younger and take a slightly higher weekly dose than patients with atrial fibrillation. Our research group designed the first and, as of yet, only acenocoumarol algorithm for patients with VTE that included the following clinical variables: age, body mass index, enzyme inducer status, amiodarone status and genetic factors (*CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE*). Although clinical variables can explain only 22% of the dose variability [12], this pharmacogenetic algorithm explains 60.6% of the dose variability and has performed well in an external cohort [32]. The algorithm can be used via the following web link: <http://www.dosisacenocoumarol.com/en/index.php> (accessed on 15 March 2021). The variables mentioned above have to be included and the recommended dose to initiate treatment is calculated.

Our next step was to design and implement a clinical trial aimed at evaluating the effectiveness and efficiency of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm compared with the standard-of-care dosage adjustment for patients with VTE.

2. Methods

2.1. Trial Design

Between March 2011 and September 2013, we conducted a pragmatic, multicentre, randomised, parallel, 2-arm, single-blind clinical trial, as described previously [33]. The study was approved by the Ethics Committee of La Paz University Hospital and by the Spanish Agency of Medicine and Health Products, registered in EudraCT (number: 2009-016643-18).

2.2. Study Population

The target population consisted of patients with newly diagnosed VTE, including PTE and DVT, who were starting therapy with acenocoumarol. The detailed inclusion and exclusion criteria have been previously described [33]. The study was authorised to be conducted in 5 hospitals in the Community of Madrid, Spain; however, one of the hospitals encountered recruitment problems, leaving 4 participating hospitals: La Paz University Hospital, La Princesa University Hospital, Hospital Infanta Sofía and Fundación Jiménez Díaz. Patients were recruited from these centres' internal medicine and emergency departments, and all participants provided their written informed consent.

2.3. Randomisation and Treatment

After inclusion in the trial, the patients were randomly assigned in a 1:1 ratio to either of 2 arms: dose adjustment using the pharmacogenetic algorithm (PGx) or standard adjustment (control). The randomisation was performed using a masked randomisation scheme, in blocks of 4 patients and stratified by centre, using a Microsoft Excel program. Randomisation envelopes containing the assigned strategy were created for each centre with the patient's code written on the outside of these envelopes. Both the envelope and the card were stored in the principal investigator's file. The subinvestigator responsible for recruitment was in charge of opening the envelopes according to patient code.

Initially, all patients were administered a standard acenocoumarol dose along with low molecular weight heparin (LMWH). On the third or fourth day of treatment (day 0 of the study), the dose adjustment was performed according to the assigned group:

- PGx group: The dose was calculated using the pharmacogenetic algorithm, which included demographic (age, sex, weight and height), clinical (use of amiodarone or inducer drugs) and pharmacogenetic (polymorphisms of *CYP2C9*, *VKORC1*, *APOE* and *CYP4F2*) variables [12].
- Control group: The dose was adjusted according to the standard procedure in routine clinical practice. As a guideline for handling and adjusting the dosages, the researchers employed the local guideline developed for managing patients treated with acenocoumarol.

2.4. Study Procedures

The patients who agreed to participate in this clinical trial had to perform a total of 8 visits in a period of 12 weeks (Table 1).

Patients with newly diagnosed VTE were identified from the emergency department or from the hospital ward within the first 48 h of the diagnosis. Those patients who met all of the inclusion and none of the exclusion criteria were asked to participate in the study. Before undergoing any study procedure, we confirmed that the patients had signed the informed consent.

On the enrolment day (days -3 or -2), all patients began treatment with acenocoumarol according to the standard clinical practice. The recommended approach was to start with 2 mg a day for patients younger than 65 years and 1 mg for older patients

or those with a bleeding risk factor. In all cases, the patients took LMWH, at least until the INR was within the therapeutic range. On the enrolment day, a blood sample (2 ethylenediaminetetraacetic acid tubes of 5 mL) was extracted and sent for genotyping. The pharmacogenetic results were returned within 48 h.

Table 1. Study procedures.

Visit	1	2	3	4	5	6	7	8
Day of study	−3 or −2	0	3	7	15	30	60	90
Window (day)	0	0	0	+/−1	+/−3	+/−5	+/−7	+/−7
Recruitment	✓							
Informed consent	✓							
Selection criteria	✓							
Medical history	✓							
Physical examination	✓							
Blood samples for pharmacogenetics	✓							✓
Randomisation	✓							
Acenocoumarol dosing initiation	✓							
Acenocoumarol dosage adjustment		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
INR determination		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Adverse effects evaluation		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Abbreviation: INR, international normalised ratio.

2.5. Genotyping

Genotyping was performed by the Laboratory of Population and Forensic Genetics of the Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology of the Faculty of Medicine at the Complutense University of Madrid, according to a previously described multiplex technique [34]. Genotyping included *CYP2C9*2* (C → T = rs1799853), *CYP2C9*3* (A → C = rs1057910), *VKORC1* (3588 G → A = rs9923231), *CYP4F2* (23454 G → A = rs2108622) and *APOE* (8041 C → T = rs7412).

On day 0 of the study and thereafter, the INR was determined from a capillary blood sample using a CoaguChek® portable coagulometer (Roche Farma SA, Madrid, Spain), and the dose was adjusted according to the group to which the patient had been randomised. All patients were followed-up for 3 months, with their INR measured on days 3, 7, 15, 30, 60 and 90 of the study. Additional unscheduled visits could be arranged, if necessary.

Adverse events were recorded during each visit through open-ended questions, physical exploration and spontaneous reporting by the patients. We employed Naranjo's algorithm to evaluate causality [35]. Re-thrombosis and haemorrhagic events were considered adverse events of special interest.

2.6. Outcome Variables

The study's primary endpoint was the percentage of patients with an INR within the therapeutic range (INR between 2 and 3) on day 7 after the start of treatment (visit 3). Co-primary endpoints included: (a) the time from the start of the oral anticoagulant therapy to achieving a stable INR within the therapeutic range (INR within the therapeutic range for 3 consecutive measurements at least 2 weeks apart, with a maximum difference between the daily average doses of 10%); (b) the number of INRs within the range in the first 6 weeks of treatment; and (c) the number of INRs within the range during the 3 months of the study. The secondary endpoints were the proportion of time within the therapeutic range from the start of treatment to the end of the follow-up; the number of additional INR measurements during the study; and the proportion of adverse events until the end of the follow-up.

2.7. Statistical Analysis

We calculated the sample size to detect an absolute difference of 20% in the number of patients within the therapeutic range on day 7 (visit 3) after starting the treatment

with acenocoumarol. Considering alpha and beta errors of 0.05 and 0.2, respectively, and assuming a 20% rate of patients lost to follow-up, the number of patients needed was 120 per study group.

There were 3 study populations: the intention-to-treat (ITT) population, defined as all randomised participants who met the selection criteria, took the study medication and had at least 1 measurement for the main efficacy variable (INR); the per protocol (PP) population, defined as all randomised participants who met the inclusion criteria, took the study medication, had at least 1 measurement for the main efficacy variable (INR) and did not miss more than 1 visit or the last visit; and the safety population, defined as all randomised participants who took at least 1 treatment dose. The main study analysis was performed using the ITT strategy.

For all primary and secondary efficacy variables related to the number of events (the number of INRs within the therapeutic range during the first 6 weeks of treatment, the number of INRs within the therapeutic range at the end of treatment, the extraordinary determinations of INRs, the number of INRs <1.5 and the number of INRs >4), we employed nonparametric approaches. We compared the median (95% CI) and median differences (95% CI) using Hodges–Lehmann estimates by means of the Mann–Whitney test and Poisson analysis.

We estimated the time to event (INR stabilisation) using the Kaplan–Meier approach and compared the treatments with the stratified log-rank test, employing Cox regression models to estimate the hazard risks and 95% CI. We estimated the proportion of time within the therapeutic range by means of linear interpolation and compared the treatments by means of Student’s t-test.

All statistical tests were applied with a 0.05 2-sided significance level. We tested the Hardy–Weinberg equilibrium to calculate the allele frequencies and performed the safety analysis using the number of adverse events reported during the study, including the number of INRs >4 or <1.5, applying the chi-squared test.

We performed the statistical analysis using the SAS system (Release 9.2).

3. Results

3.1. Patients

We recruited 149 patients, 75 of whom were randomised to the PGx group and 74 of whom were randomised to the control group (Figure 1). We did not achieve the calculated sample size due to the low recruitment rate. The ITT population consisted of 144 patients (74 in the PGx arm and 70 in the control arm). All reported efficacy results are from the ITT group, whose mean age was 59.42 (18.53) years. We recruited 77 (53.5%) men and 67 (46.5%) women. The diagnosis was DVT in 61.8% of the patients, PTE in 22.2% and both diagnoses in 16%. Table 2 shows the demographic data. The gene frequencies are presented in a Hardy–Weinberg equilibrium.

3.2. Primary Outcomes

3.2.1. INR within Therapeutic Range at Day 7 of Treatment

This was the main primary endpoint of the study. Eight patients did not have a valid INR at day 7; 72 patients in the PGx and 64 in the control group were therefore included in the primary statistical analysis. Thirty-four (47.2%) patients had an INR value within the therapeutic range (2 to 3) at day 7 after the start of treatment in the PGx group compared with 14 (21.9%) patients in the control group, a difference that was statistically significant ($p = 0.0023$). After including the eight patients with no INR values at day 7, assuming the closest INR to that day, the statistically significant difference between the two groups was maintained.

3.2.2. INR Stabilisation

A stable INR as defined in the protocol was reached by 37 patients, 21 (28.4%) of the 74 patients in the PGx group and 16 (22.9%) of the 70 patients in the control group

($p = 0.45$). The median (range) time from the start of the treatment with acenocoumarol to the first day of stable INR in the PGx group was 17 (10–30) days compared with the 15 (10–28) days for the control group ($p = 0.7929$).

3.2.3. Number of INR Readings within the Therapeutic Range

A total of 128 patients reached at least 1 INR reading within the range in the first 6 weeks of treatment, 66 (89.2%) in the PGx group and 62 (88.6%) in the control group ($p = 1.000$). During the 3 months of treatment, 135 (93.8%) patients had at least 1 INR reading within the therapeutic range, 70 (94.6%) in the PGx group and 65 (92.9%) in the control group ($p = 0.7402$).

Table 2. Baseline data.

Parameter	PGx Group (<i>n</i> = 74)	Control Group (<i>n</i> = 70)	Total (<i>n</i> = 144)
Age, years	60.12 (19.4)	58.67 (17.7)	59.42 (18.5)
Male sex, n (%)	44 (59.5)	33 (47.1)	77 (53.5)
Race, n (%)			
White/Asian	73 (98.6)/1 (1.4)	70 (100)/0 (0)	143 (99.3)/1 (0.7)
Hospitalised, n (%)	31 (41.9)	32 (45.7)	63 (43.8)
Length of hospitalisation, days	6.33 (4.15)	6.16 (3.03)	6.25 (3.59)
PTE, n (%)	18 (24.3)	14 (20.0)	32 (22.2)
DVT, n (%)	48 (64.9)	41 (58.6)	89 (61.8)
Both PTE and DVT, n (%)	8 (10.8)	15 (21.3)	23 (16)
Height, cm	165.77 (11)	165.99 (11.1)	165.92 (11.1)
Weight, kg	78.44 (16.4)	78.59 (16.4)	78.57 (16.4)
BMI	28.55 (5.3)	28.53 (5.3)	28.55 (5.2)
Amiodarone use	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.7)
Inducer use	2 (2.7)	0 (0)	2 (1.4)
CYP2C9 genotype, n (%)			
*1*1	52 (70.3)	43 (61.4)	95 (66.0)
*1*2	14 (18.9)	14 (20.0)	28 (19.4)
*1*3	6 (8.1)	5 (7.1)	11 (7.6)
*2*2	1 (1.4)	5 (7.1)	6 (4.2)
*2*3	1 (1.4)	2 (2.9)	3 (2.1)
*3*3	0	1 (1.4)	1 (0.7)
VKORC1 genotype, n (%)			
GG	31 (41.9)	24 (34.3)	55 (38.2)
GA	31 (41.9)	40 (57.1)	71 (49.3)
AA	12 (16.2)	6 (8.6)	18 (12.5)
CYP4F2 genotype, n (%)			
CC	27 (36.5)	20 (28.6)	47 (32.6)
CT	37 (50.0)	39 (55.7)	76 (52.8)
TT	10 (13.5)	11 (15.7)	21 (14.6)
APOE176 genotype, n (%)			
CC	61 (82.4)	64 (91.4)	125 (86.8)
CT	13 (17.6)	5 (7.1)	18 (12.5)
TT	0	1 (1.4)	1 (0.7)

Values are listed as mean \pm SD unless otherwise noted. * Chi-squared test. Abbreviations: BMI, body mass index; DVT, deep vein thrombosis; PGx, pharmacogenetic algorithm; PTE, pulmonary thromboembolism.

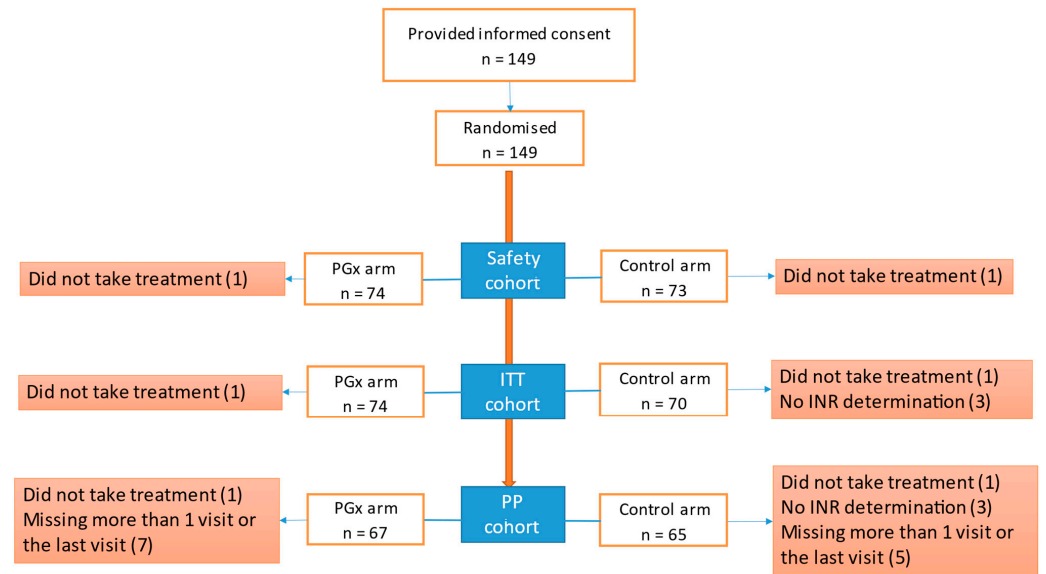


Figure 1. Flow chart of included patients. Abbreviations: ITT, intention-to-treat; PGx, pharmacogenetic algorithm; PP, per protocol.

3.3. Secondary Outcomes

Table 2. Baseline data.

Parameter	PGx Group (n = 74)	Control Group (n = 70)
The secondary outcomes did not differ significantly between the two groups. In the global assessment, the PGx group had a mean percentage of time within the therapeutic range of 54.69% (32.06) compared with 48.54% (31.50) of the control group (p = 0.4683).	48 (64.9)	41 (58.6)
Most of the patients had at least 1 unscheduled INR reading (those visits in addition to the 8 visits established in the study protocol), 55 (74.3%) in the PGx group and 56 (80%) in the control group. Nineteen (25.7%) patients in the PGx group did not have unscheduled visits compared with 14 (20%) in the control group (p = 0.5580).	55 (74.3)	56 (80)
PTE, the percentage of patients with 3 INR within the therapeutic range per visit is shown in Figure 2.	89 (61.8)	8 of 12

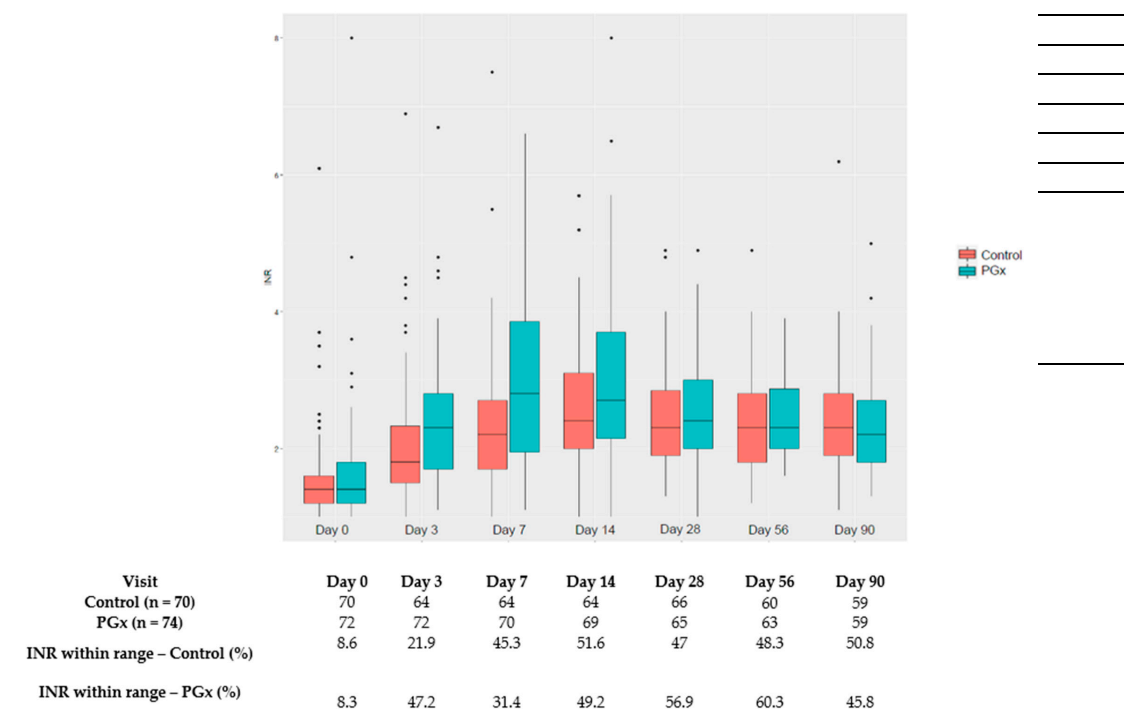


Figure 2. Percentage of patients with INR within therapeutic range per scheduled visit. * outliers.

3.4. Safety Outcomes

The incidence of adverse events did not differ significantly between the two groups (Table 3). There were two thromboembolic events, one PTE in the control group and one DVT in the PGx group. There were 6 haemorrhagic events in the PGx group and 11 in the control group. There were no differences in the number of patients with at least one INR reading above 1.5; however, more patients in the PGx group had at least one INR reading

3.4. Safety Outcomes

The incidence of adverse events did not differ significantly between the two groups (Table 3). There were two thromboembolic events, one PTE in the control group and one DVT in the PGx group. There were 6 haemorrhagic events in the PGx group and 11 in the control group. There were no differences in the number of patients with at least one INR reading below 1.5; however, more patients in the PGx group had at least one INR reading above 4 (Table 3), although this difference did not reach statistical significance ($p = 0.06$).

Table 3. Safety analysis.

AE	PGx Group <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 74)	Control Group <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 73)	Total <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 147)	<i>p</i>
Patients with at least 1 AE	10 (13.5)	14 (19.2)	24 (16.3)	0.35
Haemorrhagic events	6 (8.1)	11 (15.1)	17 (11.6)	0.18
Thromboembolic events	1 (1.4)	1 (1.4)	2 (1.4)	0.99
Patients with at least 1 INR reading <1.5	45 (60.8)	50 (68.5)	95 (64.6)	0.18
Patients with at least 1 INR reading >4	31 (41.9)	19 (26)	50 (34)	0.06

Abbreviations: AE, adverse event; PGx, pharmacogenetic algorithm.

4. Discussion

For many years, coumarin drugs were the main anticoagulants on the market worldwide. In recent years, there has been a major advance in the development of new anticoagulant drugs (direct acting anticoagulants—DOACs), with an efficacy and safety profile that has led to a decreasing use of coumarin drugs. However, in the case of Spain, and mainly due to the cost of DOACs, they are not as widely prescribed. By 2019, around 70% of the anticoagulated Spanish population was on acenocoumarol, of which more than half had inadequate INR control [36].

In recent years, numerous pharmacogenetic algorithms have been published in an attempt to improve the dose individualisation of warfarin and acenocoumarol. These algorithms can explain between 40% and 60% of the variability in drug dosing to achieve stable INRs but have certain relevant differences, such as differences in the ethnicity of the included patients, as indicated by Ragia et al. [37]. It might be preferable to use specific algorithms for each ethnic group to achieve a better prediction of the acenocoumarol dosage. The algorithms also differ in terms of the included variables (demographic, clinical and pharmacogenetic) and control arms, with some trials including clinical algorithms and others using standard care, which can differ significantly among countries. The follow-up duration also varies among studies, all of which complicates the comparison of the different algorithms.

Despite the contribution of pharmacogenetic algorithms to explain the variability in the dosing of coumarin drugs, doubts remain about their applicability in routine clinical practice. Several clinical trials and meta-analyses have been published to date on warfarin but with inconclusive results [25–30]. In the case of acenocoumarol, the results of the only two available clinical trials on acenocoumarol are also inconclusive. Verhoef et al. compared a genotype-guided dosing algorithm versus a dosing algorithm based on only clinical factors. The authors recruited patients with atrial fibrillation (83%) or venous thromboembolism (17%) who started treatment with acenocoumarol. Their findings showed that the use of genotype-guided dosing did not improve the time within the therapeutic INR range during the 12 weeks after the start of treatment [22]. The other clinical trial, conducted by Cerezo-Manchado et al. of patients with atrial fibrillation, showed that the percentage of patients reaching a steady dose within 90 days was higher in the pharmacogenetic arm (39% vs. 25%; $p = 0.038$). The authors also found that the pharmacogenetic group had a higher percentage of therapeutic INRs than the standard care group (50% vs. 45%; $p = 0.046$) [23].

The clinical trial conducted by our group compared an algorithm consisting of demographic, clinical and genetic information versus the usual clinical practice algorithm aimed

at determining the initial acenocoumarol dosage needed to achieve an INR between 2 and 3 in patients with newly diagnosed DVT and/or PTE.

Our results show that, at day 7 after starting treatment, 47% of the patients in the pharmacogenetic algorithm arm were within the therapeutic range compared with only 22% in the standard clinical practice arm. When designing the clinical trial, we selected this variable as the main primary endpoint because a delay in achieving an adequate INR in thromboembolic disease is related to adverse outcomes [31,38,39]. We therefore consider that the results confirm the utility of this pharmacogenetics algorithm in achieving a therapeutic INR soon after starting acenocoumarol treatment in this population. Verhoef et al. found similar results, showing that the time within the therapeutic range during the first 4 weeks after starting treatment was longer for the genotype-guided group (52.8% vs. 47.5%). As the authors discussed in their article, however, their analysis was not corrected for multiple testing, and it is possible that this difference was a chance finding [22]. The objective of maximising the time within the therapeutic range is important not only for patients with VTE but also for those with other diseases, as stated by Gage et al. who, in the Genetic Informatics Trial, showed the effectiveness of a pharmacogenetic algorithm in reducing adverse events in the acute setting of patients with elective knee or hip arthroplasty [40].

Two important aspects need to be considered when interpreting these results: The target patients in our trial differed from those of other studies on acenocoumarol that included mainly patients with atrial fibrillation (AF); and our algorithm was developed for patients with VTE, and therefore the target population in this trial should be maintained to validate the algorithm. It is important to emphasise that patients with VTE differ from patients with AF. According to our data, patients with VTE are younger (66 vs. 72.4 years) and require higher weekly doses of acenocoumarol (15 vs. 13.5) than patients with AF [14]. Achieving an INR within the target range as soon as possible after the diagnosis is crucial for this population, and our results show that a pharmacogenetic algorithm can help in achieving this objective, with a number needed to treat (NNT) of 4 to obtain an INR within the therapeutic range during the first week. After the first few days, however, changes are mainly driven by the previous INR results and other factors that influence INR variability in addition to pharmacogenetics. No statistical differences were found in the subsequent INR checks, which could be related to the adjustments made through the usual INR determinations, which was performed for both groups, thereby reducing the positive influence of the initial prediction reached through the pharmacogenetic algorithm. In addition to the well-known clinical practice of adjusting the acenocoumarol dosage, this influence can also be inferred from Figure 2, where the first INR readings are ameliorated in the subsequent INR determinations. This phenomenon has already been observed in a previously published trial [22]. Pharmacogenetic testing would also be especially relevant for those patients requiring extreme doses, given that their dose adjustments through INR monitoring are performed quite slowly, with progressive changes until the required stable dose is reached. According to our data, 51% of the patients required >21 mg/week or ≤11 mg/week. Preemptive genotyping of the patients could improve the results of the pharmacogenetic algorithms. The main limitations of this clinical trial are the following: the use of an intermediate variable, due to the fact that aiming for hard clinical endpoints would require a very large number of patients; the calculated sample size could not be achieved, although we did find a significant difference in the main variable despite this limitation; however, it is uncertain what the outcome would have been for some of the variables assessed that currently have a borderline statistical significance value, such as the safety assessment where possibly more patients in the PGx group would have had an INR value higher than 4. Furthermore, the non-blinded design probably allowed for closer monitoring and acenocoumarol dose adjustments after day 7 and contribute to blur the between groups differences in INR control.

In conclusion, our results suggest that the use of an acenocoumarol pharmacogenetic algorithm for patients with VTE could be useful in achieving better INR control in the first days of treatment, a highly relevant issue in VTE.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.B. and A.J.C.; methodology, H.Y.T., A.M.B. and A.J.C.; formal analysis, H.Y.T., A.M.B. and A.J.C.; pharmacogenetic analysis, A.M.L.-P., C.B.-R. and E.A.-P.; investigation, H.Y.T., A.M.B., M.Q.-D., S.F., M.G.-V., C.F.-C., M.A.R.-D., A.L., A.M.L.-P., N.R.-G., F.A.-S., C.S., O.M., J.F.G.-C., P.L., C.B.-R., E.A.-P. and A.J.C.; writing—original draft preparation, H.Y.T., A.M.B.; writing—review and editing, H.Y.T., A.M.B., M.Q.-D., S.F., M.G.-V., C.F.-C., M.A.R.-D., A.L., A.M.L.-P., N.R.-G., F.A.-S., C.S., O.M., J.F.G.-C., P.L., C.B.-R., E.A.-P. and A.J.C.; supervision, A.M.B. and A.J.C.; project administration, A.M.B. and A.J.C.; funding acquisition, A.J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant (TRA-010) from the Ministry of Health, Social Services and Equality of the Spanish Government and by the technical and financial support of IdiPAZ (Research Institute of La Paz University Hospital).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of La Paz University Hospital (protocol code FC/HULP_002; EUDRA-CT code: 2009-016643-18 and date of approval 17 December 2009).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The authors greatly appreciate the contribution of Isabel Moreno Arza for monitoring the study.

Conflicts of Interest: None declared.

Appendix A

PGx-ACE Investigation Group: Nicolas Medrano-Casique¹, Claudia Zegarra¹, Marta Velasco¹, Mario Muñoz¹, Rafael Hernández¹, Elena Ramírez¹, Jesús Frías¹, Giorgina Salgueiro², María V. Cuesta-García³, M. Soledad García-Muñoz³, María Teresa Gómez Rodríguez⁴, Pilar Pérez Egea⁴, Carlos Casanova García⁴, Laura García Regaño⁴, María Azucena Saez Berlana⁴, María Alejandra Rabanal Carrera⁴, María Pilar Martín Cerrato⁴, Manuel Sánchez López⁴, Pablo Astorga Díaz⁴, Milagros Velázquez García⁴, Francisco Javier De La Casa Sánchez⁴, Ángeles Conde Llorente⁴, María Dolores Parejo De Pablos⁴, María Patrocinio Verde González⁴, María Rosa Del Álamo Gutiérrez⁴, Ángeles Brieva García⁴, Margarita Encinas Sotillo⁴, Esther Frías Díaz⁴, Francisca Dacal Cubillo⁴, Inés Casas Jiménez⁴, Isabel Sola Vergara⁴, Fernando López Beltrán De Lis⁴, Antonio Vázquez Gallego⁴, María Teresa García Argudo⁴, María Ángeles Bueno Martín⁴, Encarnación Vega Arija⁴, Carmen Belinchón Moya⁴, Gloria Menal Arriazu⁴, María Teresa Gómez Martínez⁴, Ana Román Ruiz⁴, Laura Martín Saez⁴.

1. Department of Clinical Pharmacology. La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain
2. Department of Internal Medicine. La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain
3. Department of Hematology. La Paz University Hospital, Madrid, Spain
4. Primary Health Care Center “Barrio del Pilar”, Madrid, Spain

References

1. Konstantinides, S.V.; Torbicki, A.; Agnelli, G.; Danchin, N.; Fitzmaurice, D.; Galiè, N.; Gibbs, J.S.; Huisman, M.V.; Humbert, M.; Kucher, N.; et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 3033–3069. [CrossRef] [PubMed]
2. Wang, K.L.; Chu, P.H.; Lee, C.H.; Pai, P.Y.; Lin, P.Y.; Shyu, K.G.; Chang, W.T.; Chiu, K.M.; Huang, C.L.; Lee, C.Y.; et al. Management of Venous Thromboembolisms: Part I. The Consensus for Deep Vein Thrombosis. *Acta Cardiol. Sin.* **2016**, *32*, 1–22. [PubMed]
3. Available online: <http://www.medscape.com/viewarticle/561608> (accessed on 28 May 2020).
4. Sconce, E.A.; Khan, T.I.; Wynne, H.A.; Avery, P.; Monkhouse, L.; King, B.P.; Wood, P.; Kesteven, P.; Daly, A.K.; Kamali, F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: Proposal for a new dosing regimen. *Blood* **2005**, *106*, 2329–2333. [CrossRef] [PubMed]

5. Pei, L.; Tian, X.; Long, Y.; Nan, W.; Jia, M.; Qiao, R.; Zhang, J. Establishment of a Han Chinese-specific pharmacogenetic-guided warfarin dosing algorithm. *Medicine* **2018**, *97*, e12178. [[CrossRef](#)]
6. Gage, B.F.; Eby, C.; Johnson, J.A.; Deych, E.; Rieder, M.J.; Ridker, P.M.; Milligan, P.E.; Grice, G.; Lenzini, P.; Rettie, A.E.; et al. Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to Predict the Therapeutic Dose of Warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84*, 326–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Avery, P.J.; Jorgensen, A.; Hamberg, A.K.; Wadelius, M.; Pirmohamed, M.; Kamali, F. A Proposal for an Individualized Pharmacogenetics-Based Warfarin Initiation Dose Regimen for Patients Commencing Anticoagulation Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *90*, 701–706. [[CrossRef](#)]
8. Verde, Z.; Ruiz, J.R.; Santiago, C.; Valle, B.; Bandrés, F.; Calvo, E.; Lucía, A.; Gómez Gallego, F. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11210. [[CrossRef](#)]
9. Rathore, S.S.; Agarwal, S.K.; Pande, S.; Singh, S.K.; Mittal, T.; Mittal, B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: Proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37844. [[CrossRef](#)]
10. Kumar, D.K.; Shewade, D.G.; Lorient, M.A.; Beaune, P.; Chandran, B.S.; Balachander, J.; Adithan, C. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71*, 173–181. [[CrossRef](#)]
11. Van Schie, R.M.; Wessels, J.A.; le Cessie, S.; de Boer, A.; Schalekamp, T.; van der Meer, F.J.; Verhoef, T.I.; van Meegen, E.; Rosendaal, F.R.; Maitland-van der Zee, A.H.; et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 1909–1917. [[CrossRef](#)]
12. Borobia, A.M.; Lubomirov, R.; Ramírez, E.; Lorenzo, A.; Campos, A.; Muñoz-Romo, R.; Fernández-Capitán, C.; Frías, J.; Carcas, A.J. An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41360. [[CrossRef](#)]
13. Cerezo-Manchado, J.J.; Rosafalco, M.; Antón, A.; Perez-Andreu, V.; Garcia-Barbera, N.; Martinez, A.B.; Corral, J.; Vicente, V.; Gonzalez-Conejero, R.; Roldan, V. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb. Haemost.* **2013**, *109*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tong, H.Y.; Dávila-Fajardo, C.L.; Borobia, A.M.; Martínez-González, L.J.; Lubomirov, R.; Perea León, L.M.; Blanco Bañares, M.J.; Díaz-Villamarín, X.; Fernández-Capitán, C.; Cabeza Barrera, J.; et al. A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Anderson, J.L.; Horne, B.D.; Stevens, S.M.; Grove, A.S.; Barton, S.; Nicholas, Z.P.; Kahn, S.F.; May, H.T.; Samuelson, K.M.; Muhlestein, J.B.; et al. Randomized Trial of Genotype-Guided Versus Standard Warfarin Dosing in Patients Initiating Oral Anticoagulation. *Circulation* **2007**, *116*, 2563–2570. [[CrossRef](#)]
16. Caraco, Y.; Blotnick, S.; Muszkat, M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: A prospective randomized controlled study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 460–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kimmel, S.E.; French, B.; Kasner, S.E.; Johnson, J.A.; Anderson, J.L.; Gage, B.F.; Rosenberg, Y.D.; Eby, C.S.; Madigan, R.A.; McBane, R.B.; et al. A Pharmacogenetic versus a Clinical Algorithm for Warfarin Dosing. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2283–2293. [[CrossRef](#)]
18. Pirmohamed, M.; Burnside, G.; Eriksson, N.; Jorgensen, A.L.; Toh, C.-H.; Nicholson, T.; Kesteven, P.; Christersson, C.; Wahlström, B.; Stafberg, C.; et al. A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Warfarin. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2294–2303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wang, M.; Lang, X.; Cui, S.; Fei, K.; Zou, L.; Cao, J.; Wang, L.; Zhang, S.; Wu, X.; Wang, Y.; et al. Clinical Application of Pharmacogenetic-Based Warfarin-Dosing Algorithm in Patients of Han Nationality after Rheumatic Valve Replacement: A Randomized and Controlled Trial. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, *9*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Jonas, D.E.; Evans, J.P.; McLeod, H.L.; Brode, S.; Lange, L.A.; Young, M.L.; Shilliday, B.B.; Bardsley, M.M.; Swinton-Jenkins, N.J.; Weck, K.E. Impact of genotype-guided dosing on anticoagulation visits for adults starting warfarin: A randomized controlled trial. *Pharmacogenomics* **2013**, *14*, 1593–1603. [[CrossRef](#)]
21. Wen, M.-S.; Chang, K.-C.; Lee, T.-H.; Chen, Y.-T.; Hung, K.-C.; Chang, Y.-J.; Liou, C.-W.; Chen, J.-J.; Chang, C.-H.; Wang, C.-Y.; et al. Pharmacogenetic dosing of warfarin in the Han-Chinese population: A randomized trial. *Pharmacogenomics* **2017**, *18*, 245–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Verhoef TIRagia, G.; de Boer, A.; Barallon, R.; Kolovou, G.; Kolovou, V.; Redekop, W.K. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2304–2312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cerezo-Manchado, J.J.; Roldan, V.; Corral, J.; Rosafalco, M.; Antón, A.I.; Padilla, J.; González-Conejero, R.; Vicente, V. Genotype-guided therapy improves initial acenocoumarol dosing. *Thromb. Haemost.* **2016**, *115*, 117–125. [[CrossRef](#)]
24. Wang, F.; Guo, J.; Zhang, A. Efficacy and Safety of Genotype-Guided Warfarin Dosing in the Chinese Population: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2019**, *73*, 127–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tang, T.; Liu, J.; Zuo, K.; Cheng, J.; Chen, L.; Lu, C.; Han, S.; Xu, J.; Jia, Z.; Ye, M.; et al. Genotype-Guided Dosing of Coumarin Anticoagulants: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2015**, *20*, 387–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Franchini, M.; Mengoli, C.; Cruciani, M.; Bonfanti, C.; Mannucci, P.M. Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: A systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 1480–1487. [[CrossRef](#)]

27. Shi, C.; Yan, W.; Wang, G.; Wang, F.; Li, Q.; Lin, N. Pharmacogenetics-Based versus Conventional Dosing of Warfarin: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144511. [[CrossRef](#)]
28. Stergiopoulos, K.; Brown, D.L. Genotype-guided vs clinical dosing of warfarin and its analogues: Meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Intern. Med.* **2014**, *174*, 1330–1338. [[CrossRef](#)]
29. Belley-Cote, E.P.; Hanif, H.; D’Aragon, F.; Eikelboom, J.W.; Anderson, J.L.; Borgman, M.; Jonas, D.E.; Kimmel, S.E.; Manolopoulos, V.G.; Baranova, E.; et al. Genotype-guided versus standard vitamin K antagonist dosing algorithms in patients initiating anticoagulation. A systematic review and meta-analysis. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114*, 768–777. [[CrossRef](#)]
30. Danese, E.; Raimondi, S.; Montagnana, M.; Tagetti, A.; Langae, T.; Borgiani, P.; Ciccacci, C.; Carcas, A.J.; Borobia, A.M.; Tong, H.Y.; et al. Effect of CYP 4F2, VKORC 1, and CYP 2C9 in Influencing Coumarin Dose: A Single-Patient Data Meta-Analysis in More Than 15,000 Individuals. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *105*, 1477–1491. [[CrossRef](#)]
31. Howard, L.S.; Hughes, R.J. NICE guideline: Management of venous thromboembolic diseases and role of thrombophilia testing. *Thorax* **2012**, *68*, 391–393. [[CrossRef](#)]
32. Jiménez-Varo, E.; Garre, M.C.; Robles, V.J.G.; Gutiérrez-Pimentel, M.J.; Calleja-Hernández, M. Ángel Extrapolation of acenocoumarol pharmacogenetic algorithms. *Vasc. Pharmacol.* **2015**, *74*, 151–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Carcas, A.J.; Borobia, A.M.; Velasco, M.; Abad-Santos, F.; Díaz, M.Q.; Fernández-Capitán, C.; Ruiz-Giménez, N.; Madridano, O.; Sillero, P.L. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **2012**, *13*, 239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. López-Parra, A.; Borobia, A.M.; Baeza-Richer, C.; Arroyo-Pardo, E.; Carcas, A. A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in acenocoumarol metabolism. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 167–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Naranjo, C.A.; Busto, U.; Sellers, E.; Sandor, P.; Ruiz, I.; Roberts, E.A.; Janecek, E.; Domecq, C.; Greenblatt, D.J. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1981**, *30*, 239–245. [[CrossRef](#)]
36. Caro, L.; Polo García, C.-S.; Díaz, P. Utilización de los anticoagulantes orales de acción directa en Atención Primaria de España. Posicionamiento de SEMERGEN ante la situación actual. *Med. Fam.* **2019**, *45*, 413–429.
37. Ragia, G.; Kolovou, V.; Kolovou, G.; Konstantinides, S.; Maltezos, E.; Tavridou, A.; Tziakas, D.; Der Zee, A.H.M.-V.; Manolopoulos, V.G. A novel acenocoumarol pharmacogenomic dosing algorithm for the Greek population of EU-PACT trial. *Pharmacogenomics* **2017**, *18*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Oake, N.; Jennings, A.; Forster, A.J.; Fergusson, D.; Doucette, S.; Van Walraven, C. Anticoagulation intensity and outcomes among patients prescribed oral anticoagulant therapy: A systematic review and meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* **2008**, *179*, 235–244. [[CrossRef](#)]
39. Yetkin, U.; Karabay, O.; Onol, H. Effects of oral anticoagulation with various INR levels in deep vein thrombosis cases. *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* **2004**, *5*, 1. [[CrossRef](#)]
40. Gage, B.F.; Bass, A.R.; Lin, H.; Woller, S.C.; Stevens, S.M.; Al-Hammadi, N.; Li, J.; Rodríguez, T.; Miller, J.P.; McMillin, G.A.; et al. Effect of Genotype-Guided Warfarin Dosing on Clinical Events and Anticoagulation Control Among Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty: The GIFT Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318*, 1115–1124. [[CrossRef](#)]