

Respuesta terapéutica inadecuada a la warfarina en un paciente genéticamente susceptible

Dres. Víctor Raggio*, Pablo Neira†, Patricia Esperón‡, Br. Mariana Lorenzo§, Dr. Mario Stoll††

Área Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular (CHSCV)

Resumen

La warfarina es uno de los anticoagulantes orales más usados en la terapéutica médica, cuya dosificación requiere un monitoreo serológico (INR: International Normalized Ratio) debido a su rango terapéutico estrecho y la potencial gravedad de sus efectos adversos. La enzima codificada por el gene CYP2C9 es el principal metabolizador de la warfarina. Se ha determinado la existencia de dos variantes de este gene, relativamente frecuentes en la población, que determinan un fenotipo "metabolizador lento". Los portadores de estos alelos variantes requieren dosis menores de warfarina para lograr la anticoagulación y están expuestos a mayor riesgo de sangrado durante la anticoagulación oral con este fármaco. Se describe el caso clínico de un paciente que estando bajo tratamiento profiláctico con warfarina sufre un aumento disparado del INR y un episodio de hematuria. Se analizó el genotipo del paciente demostrándose que era homocigoto para uno de estos alelos variantes (genotipo: CYP2C9 *3/*3). Se discuten las aplicaciones de la farmacogenética en el manejo clínico de estos pacientes y la prevención de los efectos adversos de un fármaco con un rango terapéutico estrecho.

Palabras clave: WARFARINA – efectos adversos.
FARMACOGENÉTICA.

* Médico Área Genética Molecular, CHSCV y Policlínica de Genética Cardiovascular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina Prof. Adj. Departamento de Genética, Facultad de Medicina.

† Médico Emergentista, ARM San Ramón.

‡ Directora Laboratorio Área Genética Molecular, CHSCV. Prof. Adj. Cátedra Biología Molecular, Facultad de Química.

§ Estudiante de Medicina. Colaboradora Honoraria, Área Genética Molecular, CHSCV.

†† Coordinador Área Genética Molecular, CHSCV y Policlínica de Genética Cardiovascular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina.

Correspondencia: Dr. G. Mario Stoll
Bvar. Artigas 2358, Montevideo, Uruguay
E-mail: mstoll@montevideo.com.uy

Recibido: 15/4/05.

Aceptado: 5/8/05.

Introducción

La principal enzima involucrada en el metabolismo de la warfarina está codificada por el gene *CYP2C9*, en el que se han identificado varios polimorfismos que generan aloenzimas con actividad metabólica reducida. Las variantes principales –relativamente comunes en la población– son los alelos *CYP2C9**1 (variante normal) y las formas alternativas *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3. Estas últimas están determinadas por cambios aminoacídicos que generan el cambio funcional en la enzima⁽¹⁾. Estos polimorfismos genéticos (alelos o variantes de un gene frecuentes en la población) que determinan un fenotipo “metabolizador lento”, se han asociado a un riesgo aumentado de sobreactivación y de sangrado en pacientes en tratamiento con warfarina⁽¹⁾. Los individuos portadores de estas variantes son más difíciles de manejar en el momento del inicio de la anticoagulación oral y tienen un riesgo mayor de complicaciones hemorrágicas, comparados con los homocigotos para el alelo normal⁽²⁾. Estos polimorfismos explican en buena parte la adopción de protocolos progresivos de inducción, con control seriado del International Normalized Ratio (INR) en el tratamiento con warfarina.

A pesar de estos protocolos de extendido uso, los accidentes hemorrágicos son más prevenibles con el dato previo de la susceptibilidad al fármaco. Los avances en el diagnóstico molecular a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN) han permitido el ensayo de procedimientos de bajo costo y alta especificidad para caracterizar el estado portador, el tipo y números de alelos de susceptibilidad genética de los pacientes que recibirán warfarina.

El gene *CYP2C9* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q24.2) y codifica una enzima dependiente del citocromo P-450, –principal metabolizador de la warfarina–, catalizando la conversión del enantiómero S (el más potente y responsable principal del efecto anticoagulante a través de la inhibición de la vitamina K epóxido reductasa), a metabolitos 6-hidroxi y 7-hidroxi inactivos. Se han reportado diversas variantes alélicas de *CYP2C9*, siendo los alelos más importantes: *CYP2C9**1, considerado el alelo normal (el más frecuente) y dos alelos surgidos por sustituciones: *CYP2C9**2 –sustitución de arginina por cisteína en la posición 144 de la proteína– (Arg144Cys), y *CYP2C9**3 –sustitución de isoleucina por leucina en el codón 359– (Ile359Leu)⁽³⁾. Estas dos variantes se estima que están presentes en 30% de la población con frecuencias alélicas de 0,12 y 0,08 respectivamente⁽¹⁾. Está extensamente estudiado el efecto de estas dos variantes sobre la actividad enzimática y el metabolismo de varios sustratos. Los alelos *2 y *3 determinan un metabolismo deficiente de la hidroxilación de la S-warfarina in vitro. Se ha estimado que la variante *3 tiene una eficiencia de 5% y la *2 de 12% respecto del alelo normal en

relación con la metabolización de warfarina⁽⁴⁾. Ambos polimorfismos funcionales se han asociado, con evidencias consistentes, a mayores probabilidades de sangrado y dosis más bajas de mantenimiento⁽⁴⁾.

Caso clínico

El paciente es referido a la Policlínica de Genética Cardiovascular (Departamento de Cardiología de la Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas y Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular [CHSCV]) por hematuria vinculada al tratamiento con warfarina. Se trata de un paciente de 53 años, de sexo masculino, que sufre traumatismo de miembro inferior izquierdo con fractura de tibia y peroné. Atendido en una policlínica del interior del país se le inicia tratamiento con heparina de bajo peso molecular por tres días, concomitantemente con warfarina, vía oral, 5 mg/día. Posteriormente continúa con esta dosis de warfarina sin recibir otra medicación. A los 18 días del inicio del tratamiento presenta hematuria, por lo que suspende la warfarina. A los 19 días el INR era de 4,97. A los 21 días (luego de 72 horas de suspendida la warfarina) el INR era de 10. Es ingresado a nosocomio mutual y se le administra vitamina K. La hematuria cede y se le otorga el alta con un INR de 2,50 a los dos días del ingreso. A los seis y siete días de suspendida la warfarina el INR era de 2,38 y 1,81, respectivamente. De los antecedentes personales se destaca que el paciente es un ex fumador, que padeció hepatitis sin secuelas hace 30 años, no ingesta excesiva de alcohol, no recibía medicación crónica ni se refirieron otras ingestas de herbajes o suplementos alimentarios que sugirieran interacción con warfarina, u otros inhibidores de la disponibilidad de vitamina K. Del interrogatorio de antecedentes familiares no surgen datos positivos de eventos vinculables a sensibilidad a warfarina u otros fármacos dependientes de *CYP2C9*. Se plantea la hipótesis de que el paciente sea portador de una mutación en *CYP2C9* y se solicita el ingreso al programa para estudio genómico en una búsqueda retrospectiva de la causa de su diátesis hemorrágica.

Material y método

Se extrajo ADN del paciente a partir de una muestra de 2 ml de sangre periférica, por “kit” de purificación de ADN genómico (Fermentas, Lituania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mutaciones C430T (*2) y A1075C (*3) de *CYP2C9* se determinaron utilizando los “kits” de amplificación-restricción (*CYP2C9* C430T-*CYP2C9**2 y *CYP2C9* A1075C-*CYP2C9**3), amablemente cedidos para el proyecto por su fabricante, –ATGen Sistemas Moleculares (Uruguay)–, de acuerdo con las recomendaciones de la empresa. Brevemente, el método utiliza la amplifica-

ción por PCR de segmentos de ADN del gene y la detección de la presencia/ausencia de la mutación por digestión con una enzima de restricción específica y determinación electroforética de la longitud de los fragmentos generados. La interpretación del patrón de bandeo individual se hace después de electroforesis en geles de acrilamida al 6% y tinción permanente con nitrato de plata.

Análisis genómico: la interpretación de los patrones de bandeo de *CYP2C9* para las mutaciones C430T (*2) y A1075C (*3), mostró que el paciente es homocigota para la variante 3 (1075C), genotipo *CYP2C9* *3/*3 y no portador del polimorfismo *2 (figura 1).

Discusión

En un paciente sin evidencias de otras interacciones medicamentosas, el genotipo *3/*3 de *CYP2C9* explica retrospectivamente el marcado incremento del INR (hasta 10) y el evento de sangrado consecuente, como una respuesta anormal a las dosis estándar de warfarina. La variante *3 tiene una eficiencia en la metabolización de la warfarina 95% menor que la del alelo normal, por lo que en general estos pacientes requieren dosis significativamente menores de warfarina para alcanzar los valores de INR deseados. La respuesta de estos pacientes a la warfarina puede ser muy marcada con aumentos disparados de INR y eventos de sangrado⁽⁵⁾.

Como parte de la consulta de Genética Médica se realizó la investigación de la historia familiar y se asesoró al paciente en relación con su riesgo y el riesgo familiar. Ambos padres del caso índice y sus descendientes serán portadores de al menos un alelo de riesgo (*3), por lo que de ser expuestos a fármacos metabolizados por *CYP2C9* pueden sufrir eventos adversos por sobredosificación en relación con su genotipo. Se recomienda realizar el estudio genómico correspondiente para la efectiva determina-

ción del genotipo de cada individuo. Los resultados del estudio se comunicaron al paciente en una consulta de asesoramiento genético y se dirigió un informe escrito a los médicos tratantes. La mutación marca una susceptibilidad constitucional prevenible, capaz de ocasionar complicaciones iatrogénicas, que acompaña al paciente a lo largo de su vida. Es transmisible como una característica codominante, que se expresa tanto en el homocigota (dos copias) como en el heterocigota (una copia) y debe considerarse la extensión de la prevención a otros miembros de la familia que el análisis genealógico identifique como población en riesgo presumible.

Están en estudio las indicaciones previas de genotipado en pacientes que ingresan por primera vez a la terapia anticoagulante con warfarina. Aunque no se recomienda el screening poblacional, la indicación parece obvia en pacientes donde se busca la causa del evento de sobreanticoagulación o sangrado cuando existe la posibilidad técnica de la determinación.

A pesar de la búsqueda de otros polimorfismos en regiones reguladoras de *CYP2C9*, los principales causantes de disfunción siguen siendo los polimorfismos *2 y *3⁽⁶⁾. Las frecuencias de los genotipos homocigotas *2/*2 y *3/*3 o doble heterocigotas *2/*3 están en 1,6%, 1,8% y 0,4%, respectivamente, sumando 3,8% mientras que los heterocigotas (*1/*2 y *1/*3) con frecuencias de 19% y 12,1% representan 31% de una población caucásica en terapia anticoagulante, contra 65,1% de los *1/*1 en una publicación reciente⁽⁷⁾.

Independientemente de lo acertado o no de la indicación hecha al paciente del tratamiento anticoagulante en relación con su traumatismo, el caso nos advierte del incremento del riesgo relativo de aumento indeseado del INR y sus complicaciones en una fracción de alrededor de 30% de la población frente al tratamiento con warfarina. Este caso ilustra la importancia de la evaluación de SNPs

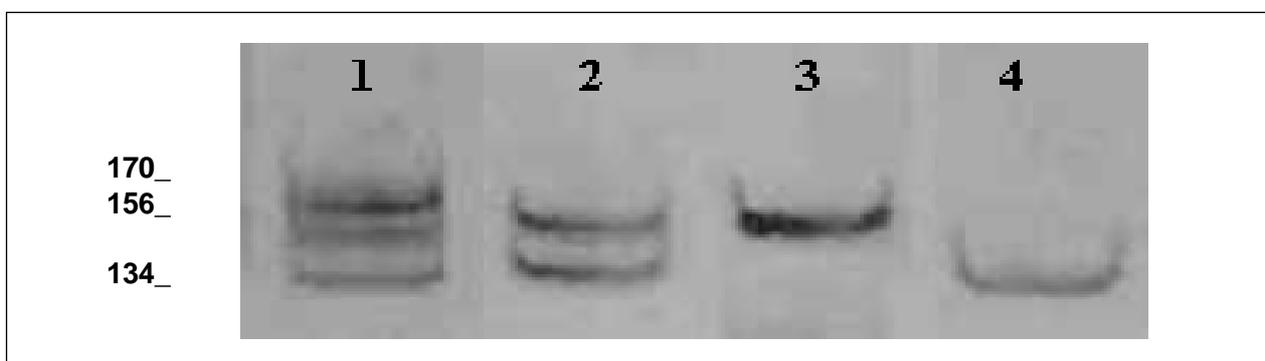


Figura 1. Visualización del polimorfismo A1075C de *CYP2C9* en gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. Carril 1: marcador de peso molecular (provisto en el kit): banda de amplificación (170 pb) y los dos posibles productos de digestión [(134 pb para el alelo A (*1); 156 pb para el alelo C (*3)]. Carril 2: individuo heterocigota AC (*1/*3). Carril 3: paciente índice homocigota mutado CC (*3/*3). Carril 4: individuo homocigota AA (*1/*1). El paciente no presentó la mutación *2 (dato no mostrado). PB: pares de base. A: adenina. C: citosina. *1: alelo normal.

(Simple Nucleotide Polymorphisms) en la explicación de la reacción individual a los fármacos y la importancia de los conceptos de estratificación clínica para la identificación de subgrupos de mayor riesgo. Casos como este, y otros similares descritos en la bibliografía internacional⁽⁸⁾, destacan la utilidad de nuevas herramientas, como los análisis genómicos en la implementación de una medicina individualizada identificando a los pacientes que más se beneficiarían de intervenciones terapéuticas específicas o minimizando los riesgos de efectos farmacológicos adversos, o ambos.

El conocimiento del perfil genómico de los pacientes comienza a ser una herramienta confiable en el proceso de toma de decisiones en las terapias individualizadas, orientadas a generar los mayores beneficios, minimizando los riesgos⁽⁹⁾. La simplificación, el abaratamiento y la automatización de los diagnósticos moleculares y la ventaja del diagnóstico por única vez, así como el fácil acceso a información genómica relevante, hacen que sea una opción a tener en cuenta frente a pacientes de alto riesgo. El valor de estos diagnósticos va más allá de la terapia individual y la intervención farmacológica actual y se extienden a la prevención en intervenciones futuras en el paciente portador y de las complicaciones y los accidentes en los fami-

liares cuando debieran ser sometidos a la misma terapia.

Consideramos que se debe recurrir a este tipo de diagnósticos para explicar eventos adversos, como aumentos disparados del INR o sangrados, y tener en cuenta esta información en futuras intervenciones farmacológicas en el paciente y en familiares portadores. La hermandad de un paciente homocigota tiene las mismas probabilidades de recibir la combinación de alelos de riesgo así como su progenie. La investigación del genotipo en estos parientes se debe considerar especialmente cuando: 1) existe consanguinidad; 2) la frecuencia del alelo es alta en la población; 3) se conoce el efecto del alelo en heterocigosis (genera fenotipos intermedios). Además, en las indicaciones más frecuentes de terapia anticoagulante con warfarina la determinación del genotipo del paciente debería tomarse en cuenta en situaciones de alto riesgo presumible independientemente de los antecedentes personales o familiares (tabla 1). La elección de fármacos tipo aspirina o los nuevos anticoagulantes orales como los inhibidores directos de la trombina, pueden ser opciones cuando estén accesibles para estos pacientes⁽¹⁰⁾.

El Área Genética Molecular de la CHSCV y la Cátedra de Cardiología del Hospital de Clínicas, motivados por las alentadoras posibilidades preventivas de esta temática,

Tabla 1. Indicaciones sugeridas de genotipado de mutaciones en CYP2C9 *2 y *3

<p>En el paciente (durante el tratamiento o como antecedente)</p>	<p>En los familiares (previo a intervención terapéutica o por solicitud preventiva)</p>
<p>Dificultad en la estabilización del INR.</p>	<p>Información previa de existencia de alelo de riesgo en familiar.</p>
<p>Aumento anormal o brusco de los valores de INR (especialmente mayor a 6) en las dosis de inducción habituales.</p>	<p>Antecedente de efectos adversos frente a fármacos metabolizados por CYP2C9 en familiar.</p>
<p>Deterioro en el control de la anticoagulación o eventos de sangrado.</p>	<p>Presunción de portadores por análisis genealógico.</p>
<p>Concomitancia de tratamiento con otros medicamentos inhibidores de o competidores de CYP2C9.</p>	<p>Homocigosis presumible para alelos de riesgo por consanguinidad parental o alta frecuencia del alelo en la población, o ambos.</p>
<p>Información previa de existencia de alelo(s) de riesgo en familiar.</p>	
<p>Antecedente de efectos adversos frente a fármacos metabolizados por CYP2C9.</p>	

INR: International Normalized Ratio

iniciaron un proyecto piloto que apunta a definir la estrategia de determinación del genotipo de los pacientes para el gene *CYP2C9* a fin de mejorar el manejo y la calidad de su tratamiento anticoagulante con warfarina y disminuir los riesgos de accidentes hemorrágicos. Los detalles del mismo se pueden consultar en: www.cardiosalud.org

Summary

Warfarin is one of the most used oral anticoagulant whose dosage needs a serologic assessment (INR: International Normalized Ratio) due to its narrow therapeutic range and the virtually severe secondary effects. The main metabolizer of warfarin is the codified enzyme for *CYP2C9* gene. There are two variants of this gene, relatively frequent, that determine a 'poor metabolizer' phenotype. Carriers of these variant alleles are at higher risk of bleeding during oral anticoagulation and need low warfarin doses to reach anticoagulation. A clinical case of a patient under prothrombotic warfarin treatment who presented a peak increase of INR and an hematuria episode is reported. The genotype of the patient was analyzed showing that it was homozygote for one allele (genotype: *CYP2C9* *3/*3). Application of pharmacogenetic in clinical management and the prevention of secondary effects are discussed.

Résumé

La warfarine est un des anti-coagulants oraux des plus utilisés en thérapeutique médicale, dont la dose requiert un monitoring sérologique (INR: International Normalized Ratio) vu son rang thérapeutique étroit et la potentielle gravité de ses effets secondaires adverses. L'enzyme codifiée pour le gène *CYP2C9* est le principal métaboliseur de la warfarine. On a déterminé deux variantes de ce gène, d'une relative fréquence dans la population, qui déterminent un phénotype "métaboliseur lent". Les porteurs de ces allèles variants requièrent des doses plus réduites de warfarine pour atteindre l'anti-coagulation et sont exposés

à un plus grand risque de saignement pendant l'anticoagulation orale avec cette substance. On décrit le cas clinique d'un patient qui, sous ce traitement prophylactique avec warfarine, souffre une augmentation subite du INR et une épisode d'hématurie. On analyse le génotype du patient pour démontrer enfin qu'il était homozygote pour l'un de ces allèles variants (génotype: *CYP2C9**3/*3). On discute les applications de la pharmacogénétique au traitement de ces patients et la prévention des effets secondaires adverses d'un médicament à rang thérapeutique étroit.

Bibliografía

1. Sanderson S, Emery J, Higgins J. *CYP2C9* gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: A HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005; 7(2): 97-104.
2. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; 353 (9154): 717-9.
3. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 *CYP2C9* polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002; 12(3): 251-63.
4. Daly AK, King BP. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics* 2003; 13(5): 247-52.
5. Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of *CYP2C9* and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(4): 202-14.
6. King BP, Khan TI, Aithal GP, Kamali F, Daly AK. Upstream and coding region *CYP2C9* polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. *Pharmacogenetics* 2004; 14(12): 813-22.
7. Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, Berg RL, Glurich I, Burmester JK. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to *CYP2C9* genotype. *Pharmacogenetics* 2004; 14(8): 539-47.
8. Bloch A, Ben-Chetrit E, Muszkat M, Caraco Y. Major bleeding caused by warfarin in a genetically susceptible patient. *Pharmacotherapy* 2002; 22(1): 97-101.
9. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 529-37.
10. Hirsh J. New anticoagulants. *Am Heart J* 2001; 142(2 Suppl): S3-8.