



## Quando determinare la sensibilità genetica agli anticoagulanti orali (warfarin)?

Gli antagonisti della vitamina K (Warfarin, acenocumarolo et al.) sono gli anticoagulanti orali più usati per la prevenzione ed il trattamento del tromboembolismo venoso, dell'infarto miocardico e dell'ictus.

Tuttavia, il loro ridotto range terapeutico e l'ampia variabilità interindividuale di risposta al dosaggio somministrato, contribuiscono ad un rischio considerevole di complicanze durante le prime settimane della terapia. (emorragiche per sovradosaggio o tromboemboliche per dosaggio insufficiente).

Studi di farmacogenetica, scienza che analizza le differenze su base genetica nel metabolismo e nella azione dei farmaci, hanno riconosciuto **due determinanti genetici della sensibilità al warfarin.**

1) da un lato i derivati della cumarina, come il warfarin (Coumadin) esercitano il loro effetto terapeutico attraverso la inibizione dell'enzima vitamina K epossido reduttasi. Polimorfismi del gene target, subunità 1 del complesso Vitamina K epossido reduttasi (VKORC1) alterano la sensibilità individuale al warfarin.

2) dall'altro lato, polimorfismi del gene CYP2C9, codificante per il citocromo P450 principale responsabile del metabolismo del warfarin, alterano la efficienza del metabolismo del warfarin.

Le varianti genetiche comuni del citocromo CYP2C9 e del complesso enzimatico VKORC1, insieme a fattori non genetici (quali età, sesso, massa corporea, dieta, abitudini voluttuarie (fumo) e la concomitante assunzione di altri farmaci) spiegano circa il 50% della variabilità del dosaggio del Warfarin.

Il [16 agosto 2007](#) la Food and Drug Administration (FDA) ha aggiornato le indicazioni che compaiono sul foglio illustrativo del warfarin, ricordando ai medici (nella sezione Precauzioni) che le persone con le varianti di VKORC1 e CYP2C9 che comportano una maggior sensibilità al farmaco, possono richiedere un dosaggio inferiore, incoraggiando implicitamente l'utilizzo dei test genetici per ottimizzare la fase di induzione della terapia anticoagulante.

Negli ultimi aggiornamenti del 2010 e 2011 FDA ha pubblicato una tabella che correla genotipi e dosaggi (vedi sezione Interpretazione del test).

---

Fatto salvo che si ritiene ancora comunque insostituibile guida alla terapia il monitoraggio dell'INR, si ricorda che la farmacogenetica del Warfarin (PGX-THROMBO test) potrebbe:

- ridurre i tempi per raggiungere un INR stabile
- aumentare il tempo in cui il paziente è all'interno del range terapeutico
- ridurre i rischi di sovradosaggio (emorragie) o sottodosaggio (eventi tromboembolici)

Pertanto **l'indicazione maggiore alla esecuzione test sarebbe nella fase precoce della terapia (prima dell'inizio o nei primi giorni)**, anche se è stato dimostrato che può essere di beneficio anche varie settimane dopo l'inizio.

Per maggiori dettagli consultare il [link](#).

---

## Come richiedere il test PGX –Thrombo test presso il Laboratorio di Tossicologia e Diagnostica Avanzata

Il test PGX – Thrombo test non è richiedibile in routine.

Non è codificato nel Sistema Informatico di Laboratorio e va richiesto utilizzando il modulo cartaceo Mod.TDA.06.

Il tempo di refertazione non è definito; verrà deciso al momento dell'eventuale introduzione in routine.

Non esiste un calendario programmato delle sedute analitiche.

Per informazioni rivolgersi alla dottoressa Nicoletta Lelli (e-mail: [n.elli@ausl.mo.it](mailto:n.elli@ausl.mo.it), tel. 31427) o alle tecniche del settore (tel. 31163).

Come il test PGX-Thrombo test determina la sensibilità genetica al Warfarin?

Il metodo utilizza una strategia basata sulla reazione polimerasica a catena (PCR) e sull'ibridazione inversa. Il protocollo analitico prevede 3 fasi:

1) ISOLAMENTO DEL DNA

2) AMPLIFICAZIONE mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers biotinilati

3) IBRIDAZIONE DEGLI AMPLIFICATI SU STRISCIA a cui sono fissate sonde oligonucleotidiche allele - specifiche secondo uno schema di bande parallele.

Le sequenze biotinilate legate alle sonde sono rivelate utilizzando fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina e, in seguito, con il relativo substrato.

Il saggio copre tre loci polimorfi:

gene	polimorfismo	Nome allele non wt	localizzazione	Ref.SNP
VKORC1	-1639 G>A <sup>1</sup>	A	promotore	rs 9923231
CYP2C9	430 C>T <sup>2</sup>	*2	esone 3	rs 1799853
CYP2C9	1075 A>C <sup>3</sup>	*3	esone 7	rs 1057910

1 Localizzato nel promotore; associato a ridotta espressione di VKORC1

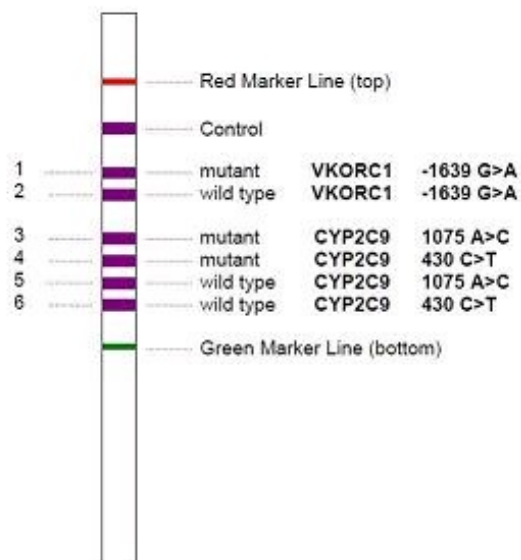
2 Mutazione missenso (esone 3). Arg 144 Cys, associata a minore funzionalità dell'enzima

3 Mutazione missenso (esone 7). Ile 359.Leu, come l'altra associata a minore funzionalità dell'enzima

**Il test – se le tre fasi sono svolte in immediata successione – si può completare in circa 6 ore.**

Le tre fasi possono essere anche eseguite in tempi diversi.

La fase 3 - completamente manuale - è quella che richiede maggior impegno e tempo: in una seduta si riescono ad ibridare fino ad 8 campioni.



A lato schema interpretativo delle varie bande delle strisce

Per ognuno dei tre loci polimorfi esaminati sono fissate alla strip due sonde specifiche una per l'allele wild type ed una per l'allele mutato.

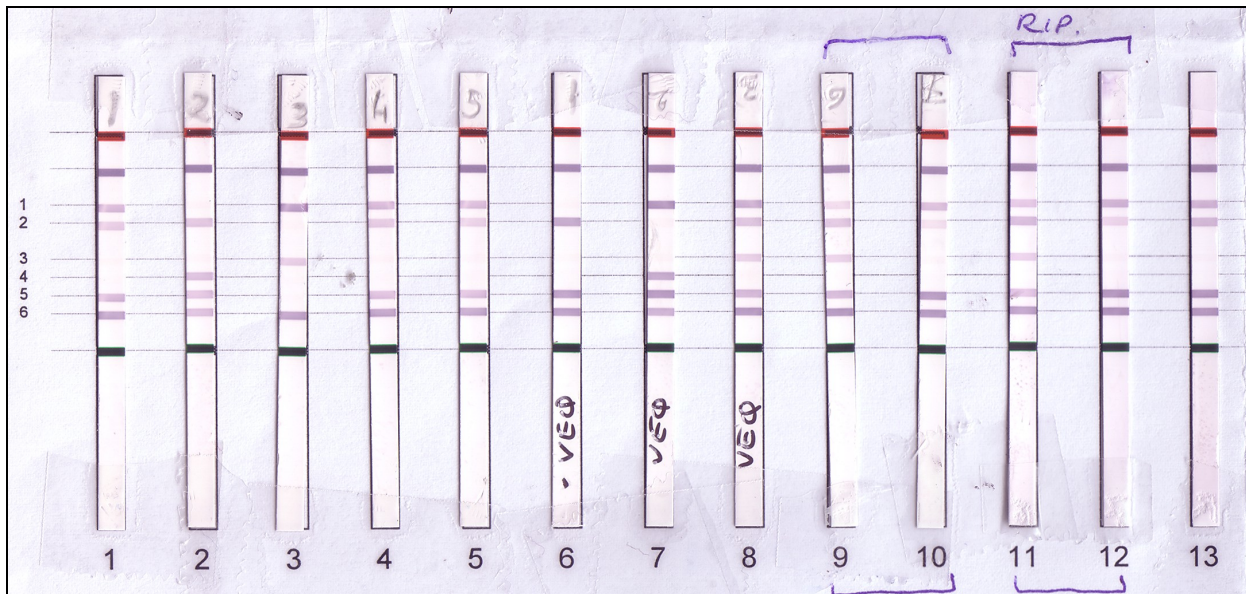
Per ognuno dei tre siti si può avere:

one di VKORC1  
a minore funzionalità dell'enzima  
ra associata a minore funzionalità dell'enzima

- omozigosi allele WT: ibrida solo banda wt
- omozigosi allele mutato: ibrida solo banda mutata
- eterozigosi: ibridano entrambe le bande

Sotto batteria di 13 strisce reali dopo ibridazione. Esempi:

- in posizione 6 omozigote WT per tutti e tre i loci polimorfi
- in posizione 3 omozigote mutato per VKORC1 – 1639 e per CYP2C9 1075



## Interpretazione e utilizzo dei Risultati

PGX – Thrombo saggia contemporaneamente i due determinanti della sensibilità genetica agli anticoagulanti orali [ad es. warfarin (Coumadin®) e acenocumarolo (Sintrom®)], quello farmacodinamico e quello farmacocinetico.

Da un lato **il test riconosce un polimorfismo comune (-1639G>A) nel promotore del gene VKORC1**, codificante la subunità 1 del complesso vitamina K epossido redattasi **bersaglio della azione dei dicumarolici (warfarin et al), che si associa ad una ridotta espressione genica**. Poiché i dicumarolici agiscono inibendo l'enzima vitamina K epossido redattasi, la presenza di una variante genica che comporta una minor produzione di enzima, implica maggiore sensibilità al farmaco e quindi la necessità di dosi mediamente più basse rispetto ai pazienti WT.

Dall'altro **il test riconosce due varianti a minor funzionalità del citocromo CYP2C9**, principale **responsabile del metabolismo del warfarin**. I portatori di tali varianti alleliche (CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 in contrapposizione all'allele wild type CYP2C9\*1) metabolizzano il farmaco con minor efficienza e richiedono dosi mediamente più basse rispetto ai pazienti WT.

*Per i più curiosi dei dettagli tecnici (nomenclatura alleli etc) consultare il file in [link](#).*

Dal foglio illustrativo [FDA](#) del warfarin (ottobre 2011) si riporta il paragrafo di raccomandazioni sul dosaggio in base alle diverse combinazioni dei genotipi del CYP2C9 e del VKORC1.

## Dosing Recommendations with Consideration of Genotype

Table 1 displays three ranges of expected maintenance COUMADIN doses observed in subgroups of patients having different combinations of CYP2C9 and VKORC1 gene variants [see *Clinical Pharmacology* (12.5)]. If the patient's CYP2C9 and/or VKORC1 genotype are known, consider these ranges in choosing the initial dose. Patients with CYP2C9 \*1/\*3, \*2/\*2, \*2/\*3, and \*3/\*3 may require more prolonged time (>2 to 4 weeks) to achieve maximum INR effect for a given dosage regimen than patients without these CYP variants.

**Table 1: Three Ranges of Expected Maintenance COUMADIN Daily Doses Based on CYP2C9 and VKORC1 Genotypes<sup>†</sup>**

VKORC1	CYP2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

<sup>†</sup>Ranges are derived from multiple published clinical studies. VKORC1 -1639G>A (rs9923231) variant is used in this table. Other co-inherited VKORC1 variants may also be important determinants of warfarin dose.

Si consiglia di esplorare il sito web: [www.WarfarinDosing.org](http://www.WarfarinDosing.org), liberamente accessibile, in cui è disponibile un algoritmo di dosaggio che tiene conto di numerose variabili fra cui i genotipi di CYP2C9 e di VKORC1.

Si ricorda infine che i test genetici non vanno ripetuti (l'esito è definitivo e immutabile!)

## TABELLA INTERPRETATIVA delle varianti alleliche di VKORC1 e CYP2C9 rilevati dal PGX THROMBO TEST

VKORC1	geno-tipo	combinazioni alleliche	<u>produzione enzima vitamina k epossido reductasi</u>	<u>prevista riduzione della dose di Warfarin rispetto all'omozigote B/B</u>
mutazione -1639G>A	G/G G/A A/A	omozigote wild type (normale) <b>B/B</b> eterozigote <b>B/A</b> omozigote mutato <b>A/A</b>	normale intermedia bassa	// -28% -50%
CYP2C9	geno-tipo		<b>metabolizzazione del WARFARIN</b>	<b>prevista riduzione della dose di Warfarin rispetto all'omozigote *1/*1</b>
mutazione 430C>T	C/C C/T T/T	omozigote wild type (normale) <b>*1/*1</b> eterozigote <b>*1/*2</b> omozigote mutato <b>*2/*2</b>	rapida intermedia lenta	// -22% -43%
mutazione 1075A>C	A/A A/C C/C	omozigote wild type (normale) <b>*1/*1</b> eterozigote <b>*1/*3</b> omozigote mutato <b>*3/*3</b>	rapida lenta lentissima	// -36% -76%
		eterozigote composto <b>*2/*3</b>	lenta	-53%

*NB1) La nomenclatura degli alleli di VKORC1 si riferisce in realtà agli aplotipi*, definiti dalla combinazione di almeno 5 diversi loci polimorfi, uno dei quali è -1639G>A. Questi polimorfismi sono in forte linkage disequilibrium e la determinazione del solo polimorfismo -1639G>A permette di definire l'aplotipo di VKORC1 come wild type B (-1639G) o mutato A (-1639A). Da ciò discendono le possibili combinazioni B/B, B/A e A/A.

*NB2) I due polimorfismi che definiscono gli alleli CYP2C9\*2 e\*3 sono in linkage disequilibrium*, il che significa che la variante che identifica l'allele \*2 (430T) non può trovarsi sullo stesso allele della variante che definisce l'allele \*3 (1075C). Esistono quindi 3 possibilità

- allele wild type o \*1 (430C e 1075A)
- allele mutato \*2 (430T e uguale al WT, cioè A in posizione 1075)
- allele mutato \*3 (1075C e uguale al WT, cioè C in posizione 430)

da cui discendono 6 possibili combinazioni

\*1/\*1 \*1/\*2 \*1/\*3 \*2/\*2 \*3/\*3 \*2/\*3

## **Bibliografia/link**

Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing

JA Johnson et al.; Clin Pharmacol Ther 90: 625 -629; advance online publication September 2011  
[doi:10.1038/clpt.2011.185](https://doi.org/10.1038/clpt.2011.185)

Genetic Warfarin Dosing

Finkelman, BS et al.; JACC (February 2011) 57 (5): 612 – 618  
[doi:10.1016/j.jacc.2010.08.643](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.08.643)

Foglietto illustrativo [FDA](#) Warfarin (October 2011)

Role of Pharmacogenomics in the Management of Traditional and Novel Oral Anticoagulants  
Cavallari LH et al.

[Pharmacotherapy. 2011;31\(12\):1192-1207](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.11.007)