

Le variabili genetiche e la loro influenza nella Terapia Anticoagulante Orale

A. Tosetto

Divisione di Ematologia e Centro per lo Studio delle Malattie Emorragiche e Trombotiche, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

Riassunto

La terapia anticoagulante orale con dicumarolici rappresenta uno dei principali presidi terapeutici per la profilassi primaria e secondaria del tromboembolismo arterioso e venoso. Tale terapia purtroppo risente di fattori individuali che rendono necessario un monitoraggio clinico e laboratoristico di tale terapia, specialmente nella fase di inizio di tale terapia (induzione), al fine di individuare la dose di farmaco ottimale per il paziente. Recentemente, sono stati descritti alcuni polimorfismi genetici (principalmente a carico dei geni codificanti l'enzima epossido-reduttasi, VKORC1, e il citocromo P2C9, CYP2C9) che concorrono a spiegare parte della variabilità intraindividuale della risposta ai dicumarolici. La valutazione dell'uso di questi polimorfismi genetici nel predire la dose individuale è stata oggetto di vari studi, che hanno dimostrato come tali polimorfismi possono essere di aiuto, diminuendo il tempo richiesto per raggiungere il target di anticoagulazione prefissato e riducendo gli episodi di eccessiva anticoagulazione in fase di induzione. Questi vantaggi sono probabilmente più rilevanti nei pazienti che abbisognano di dosi molto piccole o molto elevate di anticoagulante, e minori nei pazienti nei quali una terapia con dosi standard risulta invece adeguata. Peraltro, i maggiori costi derivanti dall'uso di queste metodiche e l'assenza di una chiara dimostrazione della riduzione di eventi trombotico-emorragici rende l'uso routinario di questi polimorfismi ancora non raccomandabile.

Summary

Genetic variables and their influence on oral anticoagulant therapy

Oral anticoagulation therapy is the mainstay for both primary and secondary prophylaxis of venous and arterial thromboembolism. The main drawback of this therapy is its wide inter-individual variation, that requires a careful clinical and laboratory monitoring, particularly during the first weeks of therapy (known as induction phase). Recently, some genetic polymorphisms have been described as partially explaining this variability. In particular, polymorphisms in the VKORC1 and in the CYP2C9 genes, encoding the epoxido-reductase and cytochrome P2C9 enzymes have been shown to be strongly associated with warfarin requirements. Various studies have addressed the role of these two polymorphisms on the prediction of warfarin requirement, suggesting that these polymorphisms may be useful to reduce the time to target INR and number of episodes with excessive anticoagulation during the induction phase. These advantages are possibly more evident in those patients requiring very high or very low doses of warfarin, less so in those patients requiring standard warfarin doses. At present, however, the burden of added costs and the lack of evidence for a reduced number of bleeding or thrombotic complications does not recommend a routine use of these polymorphisms in the clinical practice.

Key-words: Warfarin, Genotype, Anticoagulants, CYP2C9 protein, Vitamin K epoxidase, Mixed function Oxygenases/genetics, Aryl hydrocarbon hydroxylases/genetics.

Introduzione

La terapia anticoagulante orale (TAO) con dicumarolici rappresenta uno dei cardini dell'attuale terapia del tromboembolismo venoso e della profilassi primaria e secondaria del tromboembolismo arterioso¹. Se ben

condotta (cioè se il paziente è mantenuto entro l'intervallo terapeutico specifico per l'indicazione clinica), la TAO è, infatti, estremamente efficace nel prevenire gli eventi trombo-embolici, presentando al contempo un ridotto numero di eventi avversi, quest'ultimi quasi so-

Ricevuto: 30-03-2009

Publicato on-line: 04-05-2009

Corrispondenza a: Dott. Alberto Tosetto, Divisione di Ematologia e Centro per lo Studio delle Malattie Emorragiche e Trombotiche, Ospedale "S. Bortolo" - ULSS 6, Via Rodolfi n. 37, 36100 Vicenza. Tel. 0444-753679, fax 0444-753922, e-mail: tosetto@hemato.ven.it

lamente di tipo emorragico.

Purtroppo, la buona conduzione della TAO presenta due problemi. Il primo è dato dalla difficoltà a predire la dose individuale di farmaco di cui il paziente avrà bisogno, con conseguente maggiore instabilità del paziente a raggiungere l'intervallo terapeutico nelle prime settimane di inizio della TAO e conseguente maggior rischio di eventi trombotici ed emorragici in questo periodo, noto come induzione^{2,3}. Il secondo problema è dato dalla possibilità che variazioni dietetiche, dello stato di salute o interazioni farmacologiche possano intervenire sullo steady-state raggiunto dopo l'induzione modificando la biodisponibilità del farmaco e, conseguentemente, rendendo necessari successivi aggiustamenti della dose per evitare complicanze emorragiche o trombotiche.

Mentre solo un attento follow-up clinico e laboratorio può mantenere sotto controllo la TAO nel lungo termine, la predizione della dose individuale del farmaco nel periodo di induzione è da sempre stato oggetto di interesse, utilizzando modelli basati su semplici variabili quali sesso, età del paziente o risposta a dosi fisse di warfarin nei primi giorni di induzione^{4,6}. Negli ultimi anni, lo studio dei meccanismi molecolari implicati nell'azione dei dicumarolici (in particolare del warfarin) ha evidenziato come il genotipo del paziente possa predire in larga misura il suo fabbisogno di warfarin in induzione⁷. In questa review, valuteremo come tale genotipo possa essere indagato e se questo studio possa tradursi in un sostanziale vantaggio per il paziente^{8,9}.

I meccanismi molecolari che regolano l'attività dei dicumarolici

I dicumarolici agiscono bloccando la sintesi dei fattori vitamina K-dipendenti della coagulazione, la cui sintesi è dipendente dal processo di carbossilazione di un residuo glutammico in acido carbossilglutammico. Tale processo avviene in presenza di vitamina K in forma ridotta; la vitamina K epossido risultante ritorna a vitamina K ridotta mediante l'azione sequenziale di due reductasi, l'epossido reductasi e la vitamina K reductasi (Fig. 1).

La vitamina K non viene sintetizzata nell'uomo e viene assorbita dall'intestino sia dopo l'assunzione con la dieta che dopo la sintesi da parte della flora batterica residente. È pertanto evidente che la carenza di vitamina K dietetica o indotta da un danno intestinale (es., antibiototerapia prolungata) comporta un'ipovitaminosi K ed una carenza di fattori vitamina K-dipendenti, clinicamente dimostrabile da un allungamento di tempo di protrombina (PT) e di tromboplastina parziale (PTT). I dicumarolici agiscono bloccando in forma reversibile l'enzima epossido-reductasi, da cui possono essere "spiazzati" da un eccesso di vitamina K epossido (quest'ultimo è il meccanismo che spiega l'azione neutralizzante della vitamina K nel paziente anticoagulato). Poiché il meccanismo dei dicumarolici è reversibile, l'ini-

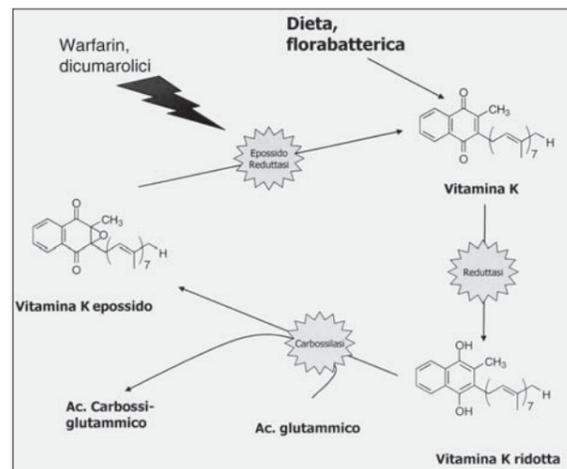


Figura 1. Il ciclo della vitamina K e gli enzimi implicati nella terapia anticoagulante orale.

bizione della produzione dei fattori vitamina K-dipendenti è direttamente correlato al grado di inibizione dell'enzima epossido reductasi.

Esistono vari meccanismi che regolano il grado di inibizione di epossido reductasi. Un primo meccanismo è determinato dall'affinità tra dicumarolico ed epossido reductasi. È noto da tempo, ad esempio, che l'isomero levogiro del warfarin ha un'attività anti epossido reductasi di circa 5 volte maggiore della forma destrogiro^{10,11}. Più recentemente però si è apprezzato come esistano delle mutazioni a carico del gene codificante l'epossido reductasi (il gene VKORC1) che determinano un'elevata resistenza di epossido reductasi all'azione dei dicumarolici, con un fabbisogno di warfarin giornaliero nei pazienti portatori di tali mutazioni variabili su 15-45 mg/die, cioè da 3 a 9 volte il fabbisogno medio^{12,13}. Tali mutazioni sono piuttosto rare nella popolazione generale (frequenza stimata circa 1 persona su 1000), ma hanno rappresentato un importante modello di lavoro sui polimorfismi funzionali di VKORC1. Sono stati infatti descritti vari aplotipi di VKORC1, con frequenza variabile tra popolazioni di diversa origine etnica, associati a una diversa sensibilità di epossido-reductasi all'azione del warfarin¹⁴. Un singolo polimorfismo, codificante per una sostituzione nucleotidica C1173T nell'introne 1 di VKORC1 è stato in particolare identificato come il fattore che nei vari aplotipi determina la maggiore variazione di dose necessaria di warfarin¹⁵. Questo polimorfismo è in *linkage disequilibrium* con un polimorfismo (G-1639A) sito all'interno del promoter di VKORC1 e che modula l'espressione di epossido reductasi. I soggetti con un genotipo 1173CC hanno una dose media settimanale di warfarin di 49 mg, a fronte di 35 mg nei soggetti 1173CT e 26 mg nei soggetti 1173TT¹⁵.

Il secondo meccanismo che regola l'inibizione di epossido reductasi è dato dai livelli plasmatici circolanti di warfarin. La biodisponibilità del warfarin assunto

Tabella I. Clearance del warfarin e conseguente fabbisogno di warfarin giornaliero, per il i genotipo CYP2C9*1/X in omo o eterozigosi.

Genotipo	Prevalenza	Attività enzimica	Dose media settimanale (mg)	Clearance del warfarin (ml/min/kg)
2C9 *1/*1	63%	100%	34.1	0.065
2C9 *1/*X	31%	50-70%	19.0	0.041
2C9 *X/*X	6%	10%	11.5	0.020

Tabella II. Meccanismi fisiopatologici dei principali polimorfismi. Sinergia dei polimorfismi CYP2C9 e 1173CT/1173TT di VKORC1 nel determinare una maggiore sensibilità al warfarin.

Gene (genotipo)	Meccanismo	A parità di INR	A parità di dose
CYP2C9(CYP2C9*2 e *3)	↓ clearance	↓ warfarinemia	↑ INR
VKORC1(1173CC)	↑ espressione di VKORC1	↑ warfarinemia	↓ INR
VKORC1(1173TT)	↓ espressione di VKORC1	↓ warfarinemia	↑ INR

per via orale è praticamente del 100%, e non sono noti meccanismi di mancato assorbimento (oltre all'azione di adsorbimento intestinale aspecifico da parte di farmaci quali la colestiramina, il sucralfato, o l'idrossido di alluminio). Il warfarin si lega però per il 97% all'albumina, e solo la parte libera agisce su epossido reduttasi. Farmaci in grado di spiazzare il warfarin dall'albumina possono pertanto determinare violenti fenomeni di inibizione completa di epossido reduttasi e conseguente sovra-scoagulazione. In assenza di tali fenomeni, l'emivita plasmatica dell'isomero levogiro del warfarin (la forma più attiva) è di circa 30 ore, ed il farmaco viene eliminato prevalentemente dalla via dei citocromi epatici¹⁶.

In particolare, il citocromo che metabolizza selettivamente il warfarin è noto come P2C9, del cui gene sono note almeno 30 forme alleliche diverse. Per una descrizione aggiornata delle varianti sinora note, si può visitare il sito <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>. La variante *wild-type* di P2C9 è nota come CYP2C9.1 ed è codificata dall'allele CYP2C9*1, mentre altre varianti alleliche (ad esempio CYP2C9*2, CYP2C9*3) hanno un'attività ridotta nei confronti del warfarin. Nella popolazione caucasica, circa il 65% delle persone presentano un genotipo CYP2C9*1/*1, pienamente funzionale, il 30% presenta un genotipo CYP2C9*1/*X con un'attività enzimatica del 50%, e circa il 5% un genotipo CYP2C9*X/*X con una attività enzimatica di circa il 10%¹⁷. Di conseguenza, rispetto agli individui omozigoti *wild-type* CYP2C9*1/*1, i soggetti eterozigoti od omozigoti per alleli CYP2C9*2 o CYP2C9*3 presentano una ridotta clearance per il warfarin ed un conseguente ridotto fabbisogno di warfarin giornaliero (Tab. I).

In conclusione, i due meccanismi molecolari che sembrano essere i maggiori determinanti della variabilità interindividuale della risposta al warfarin sembrano ri-

siedere in variazioni a carico dei geni di VKORC1 e di CYP2C9. Anche se sono stati descritti meccanismi genetici addizionali, un recente studio di *genome-wide scan* ha ulteriormente dimostrato come l'influenza di altri loci appare trascurabile¹⁸. La Tabella II riassume i meccanismi fisiopatologici dei principali polimorfismi, evidenziando la sinergia dei polimorfismi CYP2C9*1/*X e 1173CT/1173TT di VKORC1 nel determinare una maggiore sensibilità al warfarin.

Utilità clinica della valutazione dei polimorfismi genetici

Come visto, i polimorfismi a carico di CYP2C9 e di VKORC1 spiegano circa il 35-40% della variazione interindividuale del fabbisogno di warfarin¹⁵, ma assieme ad altri parametri (quali età o indici di massa corporea) possono spiegare fino al 55% della variabilità¹⁹. Questi dati hanno portato recentemente la Food and Drug Administration a licenziare l'uso di kit per la valutazione genetica prima dell'inizio della terapia anticoagulante orale negli Stati Uniti e a modificare il foglio illustrativo del warfarin per spiegare ai pazienti la possibilità di eseguire tali test. Occorre pertanto valutare criticamente se questi test debbano essere considerati utili nel prossimo futuro per la gestione del paziente che deve iniziare una terapia warfarinica. In particolare, per avere un'utilità clinica, questi dovrebbero dare una risposta soddisfacente alle seguenti domande:

La valutazione genetica può identificare i pazienti con instabilità della terapia warfarinica? Va subito precisato che i test genetici possono ragionevolmente aiutare a predire la dose che il paziente dovrà assumere per raggiungere il proprio target terapeutico, ma non hanno un valore a predire la stabilità del paziente, che è sostanzialmente influenzata dalla *compliance* del paziente stesso, dall'assunzione di farmaci interferenti o dalla comparsa di

comorbidità. È pertanto logico aspettarsi che i maggiori benefici derivanti dalla conoscenza eventuale di questi polimorfismi siano più evidenti nelle prime settimane di induzione della terapia anticoagulante orale, e si esprimano in particolare con una maggiore facilità ad entrare in range terapeutico nei pazienti in cui sia noto l'assetto genetico. Sarà invece poco razionale aspettarsi benefici a lungo termine, in particolare su *end-point* rilevanti quali l'incidenza di fenomeni emorragici o trombotici. In effetti, queste considerazioni sono supportate dagli studi clinici fin qui disponibili (vedi oltre).

La valutazione genetica predice le complicanze trombotico-emorragiche in corso di terapia warfarinica? Gli studi che hanno tentato di dimostrare che i polimorfismi genici del metabolismo del warfarin sono associati con un maggior rischio di eventi clinici sono al momento pochi e di scarsa qualità metodologica. In uno studio retrospettivo su 203 pazienti anticoagulati, Margaglione et al. hanno dimostrato come l'incidenza di eventi emorragici (maggiori o minori) nei soggetti CYP2C9*X sia circa due volte superiore nei confronti dei soggetti CYP2C9*1/*1²⁰. Un aumento del rischio di eventi emorragici di circa due volte è stato anche riscontrato nei pazienti con polimorfismo 1173CT/1173TT di VKORC1 nei confronti dei pazienti 1173CC, sempre in uno studio di tipo caso-controllo²¹. Appare pertanto prematuro proporre uno studio genetico per l'identificazione di pazienti a più alto rischio emorragico in corso di terapia warfarinica.

Quanto precisa è la stima "genetica" della dose di warfarin? Come detto, l'introduzione dei dati genetici può spiegare circa il 50-55% della variabilità interindividuale²²⁻²⁴. Confrontando la dose predetta da un modello di regressione che comprenda i dati genetici con la dose effettivamente poi assunta dal paziente, si ottiene un coefficiente di regressione piuttosto basso ($r=0,80$), che a livello individuale può comportare variazioni anche di 2 mg giornalieri tra la dose prevista e quella reale¹⁹. Queste differenze possono pertanto rendere rischioso affidarsi completamente alla previsione genetica della dose, senza comunque ricorrere ad un monitoraggio della terapia anticoagulante orale nei primi giorni di induzione.

La stima "genetica" della dose di warfarin è migliore della pratica corrente? Al momento attuale, lo standard per l'inizio della terapia anticoagulante è rappresentato dall'uso di nomogrammi basati sull'INR raggiunto dopo 3 o 4 giorni di terapia a dosi fisse di warfarin (5 mg o 10 mg)²⁵⁻²⁷. Il nomogramma di Pengo et al. è stato in grado di predire la dose settimanale con uno scarto medio di 1,6 mg di warfarin la settimana, e non appare pertanto inferiore a stime genetiche come precisione²⁵. Negli studi di Kovacs et al., l'uso di un nomogramma ha portato in range terapeutico l'83% dei pazienti trattati con 10 mg di warfarin entro i primi 5 giorni di induzione²⁷. In effetti, uno studio clinico ba-

sato su 101 pazienti randomizzati ad un algoritmo basato sui polimorfismi di VKORC1 e di CYP2C9 e 99 pazienti ad un algoritmo standard (nomogramma) non ha mostrato alcuna differenza significativa di percentuale di INR al di fuori del range terapeutico nei primi 90 giorni di terapia²⁸. Un ulteriore studio su una *inception cohort* di 297 pazienti ha valutato tre *end-point* primari (tempo di raggiungimento INR in range, numero di episodi di sovracoagulazione definiti come INR > 4 e tempo speso in range) in 297 pazienti in induzione seguiti per circa tre mesi. Differenze di dose e di INR erano significative tra i diversi genotipi di VKORC1 e di CYP2C9 nelle prime due settimane, ma dopo 4 settimane dall'inizio della terapia le differenze di anticoagulazione scomparivano²⁹. Uno studio svedese su una *inception cohort* molto ampia (1496 soggetti) ha dimostrato come i genotipi di VKORC1 e di CYP2C9 sono associati a un rischio di sovracoagulazione (INR>4) aumentato di 4,5 e 21,8 volte, rispettivamente, ma il rischio di emorragia non appare significativamente aumentato se non in sottocategorie identificate in un'analisi *post-hoc*³⁰.

L'influenza dei genotipi di VKORC1 e di CYP2C9 sui livelli di INR è stata anche valutata recentemente in una coorte di 4043 soggetti³¹, utilizzando l'80% dei soggetti come coorte di studio preliminare (*derivation cohort*) e il restante 20% come coorte di validazione (*validation cohort*). In quest'ultimo gruppo, un algoritmo basato su dati clinici e genotipici si è dimostrato superiore verso un solo algoritmo clinico nei pazienti che abbisognano di dosi molto basse o molto alte di warfarin (≤ 21 o ≥ 49 mg la settimana)³¹.

Conclusioni

Lo studio dei polimorfismi genetici di VKORC1 e di CYP2C9 appare essere al momento un modello di farmaco-genomica interessante e con possibili applicazioni future. Mentre però esiste una forte evidenza dell'associazione dei polimorfismi con la dose ottimale di warfarin (cioè con un *end-point* surrogato), restano piuttosto scarse al momento le prove di un'associazione con la stabilità dell'INR a lungo termine e con il rischio di eventi emorragico/trombotici, sempre a lungo termine.

È evidente come un utilizzo esteso di questi polimorfismi comporti un rischio di aumento dei costi legati all'inizio della terapia anticoagulante (al momento della stesura di questo articolo, stimabili intorno a 200-300 € per entrambi i test) e anche un rischio di monitoraggio meno frequente nella fase di induzione. D'altro canto, l'uso di questi test potrebbe risultare vantaggioso qualora i pazienti abbisognassero di terapie anticoagulanti di breve durata (es., per il trattamento di trombosi venose non idiopatiche, o per i pazienti fibrillanti in attesa di cardioversione elettrica).

Ulteriori risultati di studi randomizzati in corso e la prevedibile riduzione dei costi di questi test possono

modificare il campo di utilizzo della ricerca di questi polimorfismi. In attesa di questi nuovi sviluppi, l'uso dei test genetici dovrebbe essere esclusivamente riservato a scopi di ricerca clinica. In attesa di questi nuovi sviluppi, l'uso dei test genetici dovrebbe essere esclusivamente riservato a scopi di ricerca.

Bibliografia

1. Italian Federation of Anticoagulation Clinics (FCSA). A guide to oral anticoagulant treatment. *Haematologica* 2003; 88:1-52.
2. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). *Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy*. *Lancet* 1996; 348:423-8.
3. Palareti G, Manotti C, D'Angelo A, Pengo V, Erba N, Moia M, et al. Thrombotic events during oral anticoagulant treatment: results of the inception-cohort, prospective, collaborative ISCOAT study: ISCOAT study group (Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy). *Thromb Haemost* 1997; 78:1438-43.
4. Poller L, Shiach CR, MacCallum PK, Johansen AM, Munster AM, Magalhaes A, et al. Multicentre randomised study of computerised anticoagulant dosage. *European Concerted Action on Anticoagulation*. *Lancet* 1998; 352:1505-9.
5. Fitzmaurice DA, Hobbs FD, Murray ET, Holder RL, Allan TF, Rose PE. Oral anticoagulation management in primary care with the use of computerized decision support and near-patient testing: a randomized, controlled trial. *Arch Intern Med* 2000; 160:2343-8.
6. Manotti C, Moia M, Palareti G, Pengo V, Ria L, Dettori AG. Effect of computer-aided management on the quality of treatment in anticoagulated patients: a prospective, randomized, multicenter trial of APROAT (Automated PProgram for Oral Anticoagulant Treatment). *Haematologica* 2001; 86:1060-70.
7. Dumas TE, Hawke RL, Lee CR. Warfarin dosing and the promise of pharmacogenomics. *Curr Clin Pharmacol* 2007; 2:11-21.
8. Mannucci PM, Spreafico M, Peyvandi F. Dosing anticoagulant therapy with coumarin drugs: is genotyping clinically useful? No. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1450-2.
9. Thacker SM, Grice GR, Milligan PE, Gage BF. Dosing anticoagulant therapy with coumarin drugs: is genotyping clinically useful? Yes. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1445-9.
10. Breckenridge A. Oral anticoagulant drugs: pharmacokinetic aspects. *Semin Hematol* 1978; 15:19-26.
11. Kelly JG, O'Malley K. Clinical pharmacokinetics of oral anticoagulants. *Clin Pharmacokinet* 1979; 4:1-15.
12. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427:537-41.
13. Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005; 93:23-6.
14. 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; 352:2285-93.
15. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105:645-9.
16. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G, et al. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133:160S-198S.
17. Herman D, Locatelli I, Grabnar I, Peternel P, Stegnar M, Mrhar A, et al. Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose. *Pharmacogenomics J* 2005; 5:193-202.
18. Cooper GM, Johnson JA, Langae TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, et al. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood* 2008; 112:1022-7.
19. 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; 106:2329-33.
20. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000; 84:775-8.
21. Reitsma PH, van der Heijden JF, Groot AP, Rosendaal FR, Büller HR. A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk. *PLoS Med*. 2005; 2:e312.
22. 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; 84:326-31.
23. Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, Beasley TM, McGwin G, Adler BK, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European-Americans and African-Americans. *Pharmacogenomics* 2008; 9:511-26.
24. Meckley LM, Wittkowsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Venstra DL. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients. *Thromb Haemost* 2008; 100:229-39.
25. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C. A simple scheme to initiate oral anticoagulant treatment in outpatients with nonrheumatic atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2001; 88:1214-6.
26. Kovacs MJ, Anderson DA, Wells PS. Prospective assessment of a nomogram for the initiation of oral anticoagulation therapy for outpatient treatment of venous thromboembolism. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:131-3.
27. Kovacs MJ, Rodger M, Anderson DR, Morrow B, Kells G, Kovacs J, et al. Comparison of 10-mg and 5-mg warfarin initiation nomograms together with low-molecular-weight heparin for outpatient treatment of acute venous



- thromboembolism. A randomized, double-blind, controlled trial. *Ann Intern Med* 2003; 138:714-9.
28. 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; 116:2563-70.
29. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 358:999-1008.
30. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009; 113:784-92.
31. 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; 360:753-64.

