UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no processo
inflamatório em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos**

Elizandra Silva Guimarães

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Profa Dra Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no processo
inflamatório em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos**

Elizandra Silva Guimarães

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Profa Dra Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Guimarães, Elizandra Silva
G963e Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes
envolvidos no processo inflamatório em indivíduos diabéticos e
dislipidêmicos / Elizandra Silva Guimarães. -- São Paulo, 2013.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Hirata, Rosário Dominguez Crespo

1. Farmacogenética 2. Diabete 3. Expressão gênica I. T. II.
Hirata, Rosário Dominguez Crespo, orientador.

615.766 CDD

Elizandra Silva Guimarães

**Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no processo
inflamatório em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos**

Comissão Julgadora
da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa Dra Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

À minha avó, Ramona.

Provavelmente, a melhor avó que uma neta poderia ter. Minha maior companheira, meu porto seguro.

Por todos os momentos: alegria, tristeza, preocupação. Em todos eles, amor e segurança.

Vó, termino esse trabalho por você, pois foi por ele que muitas vezes não estive ao seu lado.

Meu exemplo de amor, de compreensão, de força, de perseverança, de quitutes e de tudo de bom que há na minha personalidade e na minha lembrança.

Que toda essa saudade se transforme em força para deixá-la cada dia mais feliz de um dia ter sido minha avó.

Todo o esforço, suor e recompensa retornem em bênçãos para sua luz, que sempre brilhará no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a toda espiritualidade, que me acompanharam durante todos os pequenos e grandes passos da minha vida.

Agradeço a meus queridos pais, sem o qual não teria tido essa linda oportunidade. Pelos seus suores, cada dia busco me tornar ser humano melhor e deixá-los satisfeitos e tranquilos. Graças a vocês, sou essa pessoa tão feliz e realizada.

Agradeço à tia Fia, que me deu a certeza que tudo daria certo. Até hoje sinto a paz daquele abraço! Obrigada, tia, que Deus a abençoe e ilumine. À tia Lúcia, por tudo. É a tia mais especial do mundo, te amo!

Agradeço a Monick Junho do Amaral Evangelista, por ter aberto não só a porta da sua casa, mas por ter compartilhado comigo também sua grande e unida família. Amiga, você é tão merecedora desse trabalho finalizado quanto eu! Amo você, obrigada por tudo!

Agradeço aos meus amigos, tantos! A querida amiga Aline Marques, mesmo morando longe, sempre esteve muito próxima. Aos amigos de Sampa, amigos de Campo Grande, amigos do Rio. Vocês me ajudaram a escrever cada uma dessas linhas e a dar cada um dos passos que dei para frente.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, e seu Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, com seus funcionários e professores. À Faculdade de Saúde Pública e de Medicina, e seus professores. Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa.

A toda equipe de funcionários e médicos do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, da Clínica Médica, do laboratório, equipe de enfermagem. A toda equipe da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

À querida orientadora Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata pela oportunidade, conselhos e apoio. Ao Prof Dr. Mario Hiroyuki Hirata pelo espaço, ensinamentos, conselhos. À Cristina Farjado pelo apoio e convivência.

Aos alunos do LABMAD, queridos amigos, com os quais aprendi muito. Esse trabalho também pertence a vocês.

Aos pacientes, muito obrigada pela colaboração, pelo aprendizado, pela paciência, pela oportunidade de conhecê-los e poder enxergá-los como muito mais que uma tirinha de RNA. Suas histórias mudaram minha vida de um jeito muito especial. Muita saúde e felicidade a todos vocês!

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha entrada, permanência e finalização desse importante processo da minha vida. Às pessoas especiais que encontrei na minha caminhada, e à pessoa que trilhará comigo daqui para frente.

“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.” *Osho*

RESUMO

GUIMARAES, E. S. **Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

No presente estudo foram avaliados o perfil lipídico, inflamatório e expressão gênica antes e após cada fase de tratamento de indivíduos hipercolesterolêmicos (HC) com (n=47) e sem (n=37) DM2, e 36 normolipidêmicos (NL). No grupo DM2, foi avaliado o perfil glicêmico. O grupo HC foi orientado a fazer dieta e a não utilizar hipolipemiantes por 4 semanas (fase basal, B), a seguir, tratados com ezetimiba (E: 10mg/d/4sem), sinvastatina (S: 10mg/d/8sem) e sinvastatina e ezetimiba (SE: 10mg cada/d/4sem). O grupo DM2 foi tratado com S (10 ou 20mg/d/4sem) e SE. No plasma foi quantificado, TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, MMP9, MCP1, sICAM1, sVCAM1, e-selectina, leptina, PAI-1, resistina e adiponectina e PCRus. A expressão de mRNA de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL6*, *IL1B*, *ICAM1*, *VCAM1*, *PAI1*, *LEP*, *RETN*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foi quantificada em células mononucleares por PCR em tempo real. No grupo HC, o colesterol total, LDL-c e apoB foram reduzidos em todas as fases, em comparação com o B ($p<0,05$). No grupo DM2, o tratamento com SE reduziu o colesterol total, LDL-c e apoB em comparação com S ($p<0,05$), o perfil glicêmico não foi alterado. No grupo HC, SE reduziu a concentração plasmática de adiponectina quando comparado com as outras fases ($p<0,001$). A expressão de *IL6* foi maior no grupo HC que no grupo NL, e, ao contrário, a expressão de *IL1B* foi maior no grupo NL ($p<0,05$). A expressão de *IL6* foi maior no tratamento S do grupo com maior resposta de LDL-c (tercil T3>50%, $p=0,044$) em comparação com o grupo com menor resposta (tercil T1<42%). No grupo DM2, PCRus, sICAM-1 e e-selectina foram reduzidos e sVCAM-1 aumentado, pelo tratamento SE ($p<0,05$). A expressão de *MMP9* foi diminuída na fase SE ($p<0,05$). *PAI1*, *ICAM1*, *RETN* e *ADIPOR1* tiveram maior, e *IL6* menor, expressão no grupo que utilizou 20mg que no grupo de 10mg de sinvastatina ($p<0,05$). Observou-se também que o grupo com maior resposta (T3: redução de LDL-c>30%) teve menor expressão de *LEP* e *ADIPOR1* na fase S, comparado com o grupo com menor resposta (T1: redução de LDL-c<20%) ($p<0,05$). A expressão de *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foi maior nas fases S e SE, no grupo DM2 que no grupo HC ($p<0,05$). Em conclusão, a expressão de *IL6* é maior em dislipidêmicos, e de *IL1B* maior em normolipidêmicos. A sinvastatina reduz a expressão de *IL6* e a concentração de adiponectina em dislipidêmicos. Em diabéticos, a ezetimiba reduz a concentração de PCRus, sICAM-1 e e-selectina, e a expressão de *MMP9*, *ADIPOR1* e *LEP*. Diabéticos tem maior expressão de *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* que dislipidêmicos.

Palavras-chaves: diabetes; dislipidemia; hipolipemiantes; expressão gênica.

ABSTRACT

GUIMARAES, E. S. **Lipid-lowering effects on gene expression involved in the inflammatory process in type 2 diabetes and dyslipidemic individuals.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

We evaluated lipid, inflammatory profiles, and gene expression before and after each treatment of hypercholesterolemic subjects (HC) with (n=47) and without (n=37) T2DM and 36 normolipidemics (NL). The glycemic profile was evaluated in T2DM group. The HC group had a low fat diet, without lowering-cholesterol drugs during four weeks (baseline). Afterwards, this group was treated with ezetimibe (E: 10mg/day/4weeks), simvastatin (S: 10 mg/day/8weeks), and combined E and S (SE: 10mg each/day/4weeks). The T2DM group was treated with S (10 or 20mg/day/4weeks) and SE. Plasma levels of TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, MMP9, MCP1, sICAM1, sVCAM1, e-selectin, leptin, PAI-1, resistin and adiponectin and hsCRP were measured. *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL6*, *IL1B*, *ICAM1*, *VCAM1*, *PAI1*, *LEP*, *RETN*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* mRNA expression in mononuclear cells were quantified by real time PCR. In the HC group, total cholesterol, LDL-C and apoB were reduced in all stages, compared with baseline (p<0.05). In T2DM group, SE treatment reduced total cholesterol, LDL-C and apoB compared with S (p<0.05), glycemic profile was not changed. In HC group, SE reduced plasma adiponectin compared to the other phases (p<0.001). *IL6* expression was higher in HC group, and instead, *IL1B* expression was higher in NL group (p<0.05). *IL6* expression was higher in S with higher LDL-c lowering group (tertile T3>50%, p = 0.044) compared with the lower LDL-c lowering group (tertile T1<42%). In the group DM2, hsCRP, sICAM and e-selectin were reduced and sVCAM increased by treatment SE (p<0.05). *MMP9* expression was reduced in the SE (p<0.05). *PAI1*, *ICAM1*, *RETN*, *ADIPOR1* and *ADIPOR2* had higher, and *IL6* lower, expression in the 20mg simvastatin group than 10mg group (p <0.05). It was also observed that the higher LDL-c lowering group (T3: reduction of LDL-C>30%) had lower *LEP* and *ADIPOR1* expression in S phase, compared with the lower LDL-c lowering group (T1: reduction of LDL-C<20%) (p <0.05). *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* and *ADIPOR2* expression was higher in S and SE in T2DM group than in the HC group (p<0.05). In conclusion, *IL6* expression is increased and *IL1B* decreased in dyslipidemia. Simvastatin reduces *IL6* expression and adiponectin levels in dyslipidemic. In T2DM, ezetimibe reduces hsCRP, sICAM-1 and E-selectin levels and *MMP9*, *ADIPOR1* and *LEP* expression. T2DM have higher *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* and *ADIPOR2* expression of than dyslipidemics.

Keywords: diabetes; dyslipidemia; lipid-lowering drugs; gene expression

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ADIPOQ</i>	Gene da adiponectina
<i>ADIPOR1</i>	Gene do receptor 1 da adiponectina
<i>ADIPOR2</i>	Gene do receptor 2 da adiponectina
AGEs	produtos finais de glicação avançada
ALT	alanina aminotransferase
ApoA1	apolipoproteína A1
ApoB	apolipoproteína B
AST	aspartato aminotransferase
B2M	beta-2-microglobulina
cDNA	DNA complementar
CK	creatina quinase
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DEPEC	dietilpirocarbonato
DM2	Diabete tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAM	6-carboxifluoresceína
GAPD	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HC	hipercolesterolêmicos
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMBS	hidroximetilbilano sintase
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HPRT1	hipoxantina fosforibosiltransferase 1
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
<i>IL6</i>	gene da interleucina-6
IL-6	Interleucina 6
<i>IL1B</i>	gene da interleucina-1 beta
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IMC	índice de massa corporal
KCl	cloreto de potássio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLox	lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
<i>MGB</i>	<i>minor groove binder</i>
<i>MMP9</i>	gene da metaloproteinase-9

MMP-9	metaloproteinase-9
NFQ	<i>non-fluorescent quencher</i>
NF- κ B	fator nuclear κ B
NL	normolipidêmicos
NOS	óxido nítrico sintetase
PAI1	gene do inibidor do ativador do plasminogênio
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PCRus	proteína C-reativa
PKC	proteína quinase C
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
RT	transcrição reversa
RETN	gene da resistina
SDHA	succinato desidrogenase, subunidade A
T4	tetraiodotironina
TG	triglicérides
TNFA	gene do fator de necrose tumoral alfa
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TSH	hormônio estimulador da tireóide
UBC	ubiquitina C
UNG	uracil N-glicosilase
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1
VIC	<i>vaccine-type-specific</i> . Fluoróforo que emite fluorescência em 340nm.
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Casuística e Protocolo Terapêutico	12
3.2. Amostras Biológicas e Determinações Laboratoriais	13
3.3. Obtenção de RNA de células mononucleares	13
3.4. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	14
3.5. Análise estatística dos resultados	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Dados dos participantes do estudo	20
4.2. Perfil inflamatório e de adesão	25
4.2. Resultados de expressão de mRNA em CMSP	28
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS	49
9. ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

A diabetes representa um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por defeitos na secreção, ação ou ambos, da insulina. A hiperglicemia crônica da diabetes resulta em danos que podem ser de curto prazo, como perda de peso, poliúria, polidipsia, sensibilidade aumentada a infecções, e de longo prazo, como retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia que pode resultar na disfunção renal, neuropatia periférica com risco de úlceras e amputações nos membros e artropatia neuropática, neuropatia autônoma causando sintomas gastrintestinais, genitourinárias e cardiovasculares, e disfunção sexual (ADA, 2013).

Pacientes com diabetes tem uma incidência maior de doença aterosclerótica cardiovascular periférica arterial e doença cerebrovascular, assim como hipertensão e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas (ADA, 2013).

A estimativa global de diabetes nos adultos foi de 366 milhões de pessoas (6,4% da população) em 2011, e esse valor é estimado em 522 milhões em 2030 (7,7% da população) (IDF, 2011). No Brasil, o Censo de Diabetes realizado pela Sociedade Brasileira de Diabetes em parceria com o IBGE estimou, em 2012, 12 milhões de pessoas afetadas (6% da população) (SBD, 2012).

A diabetes tipo 2 (DM2) é a forma predominante e abrange cerca de 80-90% dos casos (ADA, 2013; SBD, 2012). O aumento da prevalência de DM2 está intrinsecamente relacionada o aumento da idade, o estilo de vida, como o sedentarismo, aumento na ingestão de alimentos ricos em carboidratos e gorduras saturadas (ADA, 2013; Colagiuri *et al.*, 2009).

PATOGÊNESE DA DIABETE

O aumento da concentração plasmática de glicose, como ocorre no período absorptivo, estimula a liberação de insulina. A insulina estimula a captação de glicose principalmente pelos tecidos hepático e muscular, e suprime a produção endógena de glicose. O glucagon, por sua vez, também exerce papel importante na homeostase da glicose, liberando a glicose armazenada no fígado no estado pós-absorptivo. Em condições de hiperinsulinemia, a produção de glucagon é inibida, a produção hepática de glicose é reduzida (DeFronzo, 2004).

As ações metabólicas da insulina são, em grande parte, mediadas pelas vias de sinalização PI3K/MAPK, promovendo a captação da glicose no músculo estriado pela estimulação da translocação do transportador GLUT4. A insulina estimula a produção de ácido nítrico (NO), endotelina-1 (ET-1) e estimula a reabsorção de sódio e água no endotélio vascular (Muniyappa *et al.*, 2012). A secreção da insulina induzida pelos hormônios GIP e GLP1 é um fator importante na regulação da homeostase da glicose (Retnakaran *et al.*, 2012; Schäfer *et al.*, 2012).

Além da redução das concentrações circulantes de glicose, a insulina tem efeito antilipolítico, que faz aumentar a captação de glicose no músculo estriado e contribui com a inibição da produção hepática de glicose; e antiapoptótico, ao melhorar a função das células β do pâncreas, e estimular proliferação destas células (DeFronzo, 2004; Tesouro *et al.*, 2011; Retnakaran *et al.*, 2012).

O tecido adiposo visceral (TAV) também participa a homeostase da glicose pela regulação da liberação de ácidos graxos livres a partir de triglicerídeos. Esse tecido produz adipocinas, que reduzem a sensibilidade à insulina no músculo estriado e no fígado (Tesouro *et al.*, 2011).

A resistência à insulina reduz a secreção e a ação de ambos GIP e GLP1, comprometendo a homeostase da glicose (Retnakaran *et al.*, 2012; Schäfer *et al.*, 2012). No tecido adiposo, leva ao aumento da lipólise, com subsequente aumento de glicerol e ácidos graxos livres na corrente sanguínea, que por sua vez, contribuem para o aumento da resistência à insulina nos músculos estriados e o aumento da produção hepática de glicose (DeFronzo, 2004; Tesouro *et al.*, 2011). Em indivíduos resistentes a insulina, há um desbalanço nas ações da insulina, há maior produção e liberação de ET-1 em detrimento de NO, promovendo a aterogênese (Tousoulis *et al.*, 2007)

A hiperglicemia induz a expansão do TAV, ao aumentar o número e o tamanho dos adipócitos, aumentar a infiltração de células mononucleares, e a diferenciação e apoptose de adipócitos (Wellen *et al.*, 2003; Vykoukal *et al.*, 2011). Dessa forma, o tecido adiposo secreta citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas biotivas, como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a proteína C reativa (PCRus), inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), adiponectina, leptina, entre outros, capazes de regular o metabolismo de glicose e de lipídios (Pickup *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2003; Wellen *et al.*, 2003). A expansão do TAV também produz espécies reativas de oxigênio derivadas de NADPH oxidase que resulta no

desenvolvimento de estresse oxidativo sistêmico e anormalidades metabólicas (Colagiuri *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2010; Tesauro *et al.*, 2011).

As proteínas de fase aguda são produzidas e secretadas primeiramente pelos hepatócitos como resposta inflamatória aguda ao tecido danificado. A PCRus é uma proteína de fase aguda e tem potencial papel na patogênese da lesão ateromatosa. É considerada um preditor independente de complicação cardiovascular e tem sido também implicada no desenvolvimento e evolução de DM2 (Torres *et al.*, 2003; Emerging Risk Factors Collaboration, 2012).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória expressa em células endoteliais, musculares lisas e adipócitos, induz a migração de macrófagos para o tecido adiposo e a adesão de leucócitos ao endotélio, prejudica a ação da insulina no transporte de glicose no tecido adiposo (Lofgren *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2008; Tesauro *et al.*, 2011). Através das vias inflamatórias dependentes de NF- κ B, o TNF- α induz as células endoteliais a expressar molécula de adesão vascular células 1 (VCAM1), endotelina 1 (ET-1), e células musculares lisas a expressar metaloproteinases de matriz (MMPs), contribuindo para a desestabilização da placa ateromatosa, e suprimindo a expressão de óxido nítrico sintase (NOS), também através da inibição da ação da insulina (Schenk *et al.*, 2008; Alexandraki *et al.*, 2010; Tesauro *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2012).

A IL-6 exerce efeitos estimuladores múltiplos no crescimento celular e inflamatório, estando envolvida no início e na manutenção da resposta inflamatória aguda, aumenta o metabolismo da glicose, direta e indiretamente por sua ação nas células musculares estriadas, adipócitos, hepatócitos e células beta pancreáticas (Scheller *et al.*, 2006). A interleucina 1 (IL-1 β) é uma citocina proinflamatória mediadora precoce da inflamação em indivíduos com histórico de doenças cardiovasculares e o aumento de IL-1 β e IL-6 está associado com maior risco de indivíduos obesos desenvolverem diabetes (Spranger *et al.*, 2003; Wæhere *et al.*, 2004).

PAI-1 é uma proteína determinante no processo fibrinolítico, expressa principalmente pelo tecido adiposo, que inibe a atividade dos ativadores do plasminogênio para prevenir a superprodução de plasmina (Pires *et al.*, 2012). Está relacionada com o TAV e triglicerídeos e aumentada no diabetes, mas o processo pelo qual os adipócitos secretam grandes quantidades de PAI-1 ainda não está claro. Há indícios que a plasmina pode destruir a membrana basal dos adipócitos, deixando espaço para seu crescimento (Pires *et al.*, 2012; Poplis, 2011). A expressão de PAI-1

expressão está aumentada, na placa aterosclerótica, e pode contribuir para seu desenvolvimento por produzir uma matriz de fibrina, que contribui para a adesão de células mononucleares e LDL-ox, e promove a proliferação de células musculares lisas (Poplis, 2011). A adiponectina é uma adipocina produzida principalmente, no tecido adiposo. A adiponectina estimula a produção de NO, reduz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e diminui a produção de citocinas pelos macrófagos ao inibir a sinalização de NF- κ B, suprime a transformação de macrófagos em células espumosas (Hansen *et al.*, 2010;). A adiponectina se liga a dois receptores transmembrana ADIPOR1 e ADIPOR2, sendo o primeiro predominante expresso no músculo estriado e o segundo, no fígado (Ouchi *et al.*, 2007). É considerada antiinflamatória e potencialmente antiaterogênica (Yi *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012). A adiponectina circulante está diminuída em indivíduos obesos, com resistência à insulina ou DM2 e com doença coronariana (Yi *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012).

A resistina é outra importante adipocina expressa no tecido adiposo e em monócitos. A concentração plasmática de resistina está positivamente correlacionada com a de marcadores inflamatórios pró-aterogênicos, como IL-6, TNF- α , ET-1, VCAM-1 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (Hivert *et al.*, 2008; Fargnoli *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012). O aumento de resistina plasmática está relacionado com maior risco cardiovascular, angina instável e com prognóstico ruim para DAC (Fargnoli *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012).

A leptina é uma adipocina expressa e secretada principalmente pelos adipócitos, cuja função fundamental é a regulação do apetite (Myers *et al.*, 2008). Está implicada em diversos processos aterogênicos, como aumento da agregação plaquetária, trombose, aumento da produção de citocinas, como TNF- α e IL-6 (Hansen *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011).

A MCP-1, também conhecida como quimiocina ligante 2 (CCL2) é uma das quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de monócitos para o tecido adiposo, predominantemente produzida por macrófagos e células endoteliais (Kanda *et al.*, 2006). Esse recrutamento e consequente aumento de sua expressão é responsável pela amplificação do estado inflamatório e aumento da resistência insulínica associado à obesidade (Kanda *et al.*, 2006).

Os mecanismos de hiperglicemia, hiperinsulinemia, altas concentrações plasmáticas de triglicérides e de fatores da resposta inflamatória como a PCRus já

explicados anteriormente podem ser resumidos na **figura 1**, que ilustra de os eventos macrovasculares gerais que podem contribuir para a aterosclerose.

Figura 1. Mecanismos que podem contribuir para o progresso da aterosclerose. CRP: proteína C-reativa; FFA: *free fatty acids*, HDL: lipoproteína de alta densidade; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. Fonte: Libby *et al.*, 2002

DIABETE, DISLIPIDEMIA E ATEROSCLEROSE

A dislipidemia da diabetes é caracterizada por aumento de triglicerídeos (TG) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) pequenas e densas, e redução de lipoproteína de alta densidade (HDL). Esse perfil lipídico aterogênico contribui para o aumento do risco cardiovascular em pessoas com DM2 (Krauss, 2004; Miller *et al.*, 2010; Arca *et al.*, 2012).

Como comentado anteriormente, a resistência à insulina aumenta a mobilização de ácidos graxos dos adipócitos para o fígado, onde são utilizados como substratos para a síntese de TG. Também ocorre aumento da expressão hepática de apolipoproteína B (apo B) que é incorporada juntamente com os TG e colesterol na lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Dunn, 2010). Os TG da VLDL sofrem hidrólise pela lipoproteína lipase dando origem à lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e principalmente as partículas de LDL circulantes.

Na diabetes há aumento da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) que é responsável pela troca de colesterol éster da HDL para VLDL e LDL, em troca por TG (Krauss, 2004). Dessa forma, as LDL tornam-se mais ricas em colesterol esterificado

(menores pequenas e mais densas) e, portanto, mais aterogênicas e mais suscetíveis à oxidação (Krauss, 2004; Dunn, 2010; Miller et al., 2010). As HDL ficam mais ricas em TG e sofrem maior taxa de captação hepática, observando-se redução de HDL circulante.

As células endoteliais constantemente produzem substâncias vasoativas e tróficas, como tromboxanas, endotelina 1, prostaciclina I, NO, peróxido de hidrogênio e outras, que controlam o crescimento das células musculares lisas vasculares, a função plaquetária e a coagulação e a inflamação (Mestas *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2010). Em resposta a estímulos como hiperglicemia e aumento de ácidos graxos livres, a função das células endoteliais é desregulada, havendo aumento de expressão de moléculas de adesão, de síntese de fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, de estresse oxidativo, e modulação alterada do tônus vascular (Mestas *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2010). Essa disfunção endotelial ocorre precocemente no processo aterogênico e contribui para a formação, progressão e complicações da placa aterosclerótica (Mestas *et al.*, 2008).

A oxidação de LDL circulantes leva a formação de partículas de LDL oxidada (LDLox) que se acumulam na camada íntima das artérias, ativam as células endoteliais e aumentam a expressão de moléculas de adesão, como o VCAM1, e a secreção de quimiocinas, como o MCP-1, contribuindo para o recrutamento local de leucócitos (Libby *et al.*, 2010; Sitia *et al.*, 2010). Quando macrófagos infiltram-se camada íntima do endotélio onde está se formando a placa aterosclerótica, eles aumentam a captação de LDLox e formam as células espumosas, importantes no processo de secreção de mediadores inflamatórios, como metaloproteinases e fator tissular (Mestas *et al.*, 2008; Libby *et al.*, 2010), como apresentado na **figura 2**. A interação de LDLox e a CRP forma um complexo pró-aterogênico que acelera o desenvolvimento da aterosclerose (Libby *et al.*, 2010).

Figura 2. Ação monocitária no processo de aterosclerose. Fonte: Libby *et al.*, 2010

No trabalho de Ray e colaboradores (2009), foram observadas placas ateroscleróticas de indivíduos diabéticos com maior infiltrado celular inflamatório e área necrótica, quando comparados com indivíduos não-diabéticos. Nesse estudo, também foi observada expressão aumentada de TNF- α na placa aterosclerótica (Ray *et al.*, 2009).

As proteínas inflamatórias de fase aguda, como a CRP e MMPs extracelular 2 e 9, produzidas por macrófagos, estão implicadas na ruptura de placas ateroscleróticas, uma vez que as MMPs estão envolvidas na degradação de matriz celular e colágeno, presentes na capa fibrosa da placa ateromatosa (Ray *et al.*, 2009). A manutenção da condição inflamatória, indicada pelo aumento das concentrações de PCRus, é um estímulo para ativação de moléculas de MMP-9, ambas aumentadas no plasma de pacientes com placas instáveis (Cuccurullo *et al.*, 2006).

HIPOLIPEMIANTES

Além do tratamento da diabetes para reduzir as complicações a curto e longo prazo, a terapia da dislipidemia deve ser introduzida para reduzir o risco cardiovascular, além de mudanças no estilo de vida, tais como dieta saudável, perda de peso, exercícios físicos, abstinência de cigarros e álcool (Bell *et al.*, 2011). Há várias classes de medicamentos disponíveis para o tratamento da dislipidemia, como os inibidores da síntese (estatinas) e de absorção (ezetimiba) do colesterol (Krysiak *et al.*, 2011).

As estatinas são potentes inibidores da hidroximetilglutaril Coenzima A redutase (HMGCR), enzima chave na síntese do colesterol (Endo, 2004). A inibição da síntese do colesterol nos hepatócitos resulta na maior expressão de receptores de LDL

e, conseqüentemente, no aumento da taxa de remoção das partículas de LDL da corrente sanguínea (Endo, 2004), que resulta na redução da colesterolemia. O esquema com a descrição do mecanismo de ação das estatinas é apresentado na **figura 3**. Além de diminuir a concentração plasmática de LDL, as estatinas aumentam as concentrações de HDL e podem aumentar o tamanho das partículas de LDL (Endo, 2004; Schönbeck *et al.*, 2004).

A inibição de HMGCR pelas estatinas resulta na redução na síntese de mevalonato e de isoprenóides, como o farnesil-pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP), intermediários da síntese de colesterol. O FPP e o GGPP modulam a atividade pós-transcricional das proteínas pequenas GTPases das famílias Ras e Rho, mecanismo conhecido como isoprenilação e que pode regular inúmeras vias metabólicas (Endo, 2004; Schönbeck *et al.*, 2004). A inibição da síntese de isoprenóides pelas estatinas tem sido associada com efeitos pleiotrópicos, tendo sido descritos efeitos anti-proliferativos e antiinflamatórios (Schönbeck *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2011).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas são responsáveis por diminuir a inflamação sistêmica (redução de PCR e citocinas inflamatórias), reduzir o estresse oxidativo, melhorar a função endotelial (biodisponibilidade de NO e angiogênese) e de células musculares lisas, manter a homeostase (inibição do fator tissular, agregação plaquetária e PAI-1), estabilizar a placa aterosclerótica (redução da produção de collagenases e MMPs) parede vascular (inibição de MMP, volume da placa e espessura do vaso) (Kolovou *et al.*, 2008).

Na prática clínica, a sinvastatina reduz a morbidade e mortalidade em DAC, a incidência de derrame, e os novos casos de DM2, assim como todas as causas de mortalidade relacionadas à DAC (Kolovou *et al.*, 2008).

Figura 3. Etapas de síntese do colesterol e ação das estatinas. Fonte: Wang *et al.*, 2009.

A ezetimiba é membro de uma classe de agentes hipolipemiantes conhecida como inibidores da absorção de colesterol, que bloqueia a absorção intestinal de colesterol e fitoesteróis através da interação com o transportador de esterol, proteína Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1), localizado na borda em escova da membrana intestinal das células epiteliais (Davis *et al.*, 2007; Bays *et al.*, 2008). A inibição de absorção de colesterol resulta na depleção intracelular do colesterol e consequente aumento da remoção plasmática de LDL pelo fígado e redução da colesterolemia (Davis *et al.*, 2007). Além disso, a ezetimiba pode bloquear o receptor NPC1L1 no fígado, responsável pela regulação da concentração biliar de colesterol (Davis *et al.*, 2007; Bays *et al.*, 2008).

A ezetimiba reduz a absorção intestinal de colesterol em aproximadamente 50% e as concentrações plasmáticas de LDL colesterol em 18% e de triglicérides (TG) e apolipoproteína B (apoB) em 14% (Davis *et al.*, 2007; Bozzeto *et al.*, 2011). Quando administrada com sinvastatina, a ezetimiba leva a maior diminuição de TG e apoB e de LDL colesterol e ao aumento de HDL colesterol comparada com o tratamento com placebo e a monoterapia com estatinas, em populações similares em idade, sexo e etnia, em pacientes hipercolesterolêmicos com ou sem DM2 (Bays *et al.*, 2008; Catapano *et al.*, 2008; Tomassini *et al.*, 2009; Friedman *et al.*, 2011).

A monoterapia com ezetimiba ou combinada com sinvastatina não oferece maiores riscos à saúde: o risco de miopatia, dano hepático, colecistite, pancreatite e neoplasmas são similares aos riscos da terapia com placebo (Davis *et al.*, 2007; Sarigiani *et al.*, 2010; Bozzeto *et al.*, 2011).

A ezetimiba pode auxiliar nos efeitos pleiotrópicos das estatinas, ao reduzir ainda mais a resistência à insulina, marcadores inflamatórios e perfil lipídico, efeitos importantes em pacientes DM2 (Tojo *et al.*, 2009; Sarigianni *et al.*, 2010).

Os mecanismos de ação antiinflamatória das estatinas ainda não estão completamente elucidados, dessa forma é de interesse estudar o papel de estatinas e da ezetimiba na modulação da expressão de genes de resposta inflamatória e seu efeito sobre marcadores metabólicos e inflamatórios, em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório e adesão celular, em indivíduos diabéticos e dislipidêmicos, comparando-os com o perfil de indivíduos normolipidêmicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de mRNA de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL6*, *IL1B*, *ICAM1*, *VCAM1*, *PAI1*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *RETN* e *LEP*, em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos com e sem diabetes.
- Avaliar e comparar os efeitos de sinvastatina e ezetimiba sobre a expressão de mRNA em células mononucleares e de marcadores inflamatórios e de adesão celular, no plasma, em indivíduos hipercolesterolêmicos com e sem diabetes.
- Avaliar a relação entre a expressão de mRNA e o perfil de resposta a hipolipemiantes em hipercolesterolêmicos e diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística e Protocolo Terapêutico

Foram selecionados indivíduos hipercolesterolêmicos (HC) com (n=37) e sem (n=47) DM2 e 36 normolipidêmicos e não-diabéticos (NL), na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), com indicação para o uso de hipolipemiantes (LDL colesterol ≥ 160 mg/dL), segundo os critérios da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SBC, 2007) e triglicérides inferiores a 350 mg/dL.

Não foram incluídos, no estudo, indivíduos com alguma forma de hipercolesterolemia secundária, doença tireoidiana, doença hepática ou renal grave e mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais, e indivíduos que não aceitaram participar do estudo.

Os indivíduos HC foram orientados a fazer dieta com baixo conteúdo de colesterol e gordura saturada e sem tratamento hipolipemiante por quatro semanas. Após esse período os indivíduos com concentração sérica de LDL colesterol superior a 160 mg/dL passam por três fases de tratamento: ezetimiba (E, 10 mg/dia/4semanas); sinvastatina (S, 10mg/dia/8semanas); e ezetimiba e sinvastatina (SE, 10 mg/dia/4semanas, cada). Os diabéticos passam por duas fases de tratamento: sinvastatina (S, 10 ou 20 mg/dia/4semanas); e ezetimiba e sinvastatina (SE, 10mg/dia/4semanas, cada). Esse protocolo de tratamento permitiu avaliar o comportamento de marcadores inflamatórios em indivíduos dislipidêmicos e diabéticos frente a um agente hipolipemiante do tipo estatina (sinvastatina) e não-estatina (ezetimiba), e analisar os efeitos de estatinas por via independente da redução do colesterol.

A resposta ao tratamento com hipolipemiantes foi avaliada pela concentração de LDL colesterol e outros lipídeos, após cada fase do protocolo. As concentrações de alanina aminotransferase (ALT) e creatina quinase (CK) foram determinadas para avaliar a segurança dos medicamentos durante o protocolo de pesquisa.

Dados como cor da pele, prática de atividade física, uso de medicamentos, bebidas alcoólicas e cigarros, histórico familiar de doença arterial coronariana (DAC), presença de menopausa, foram obtidos através de uma entrevista realizada com o paciente no momento da triagem. Informações de exames, aferição da pressão arterial,

medicamentos prescritos, peso, altura, idade, hipertensão, foram obtidos através do prontuário do paciente.

O protocolo de pesquisa do qual os pacientes participaram faz parte de um projeto principal aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HU/USP (699/06) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (426) da USP. O Termo de Consentimento Livre e Informado foi firmado pelos pacientes que concordaram em participar do estudo.

3.2. Amostras Biológicas e Determinações Laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas, após jejum de 12-14 horas, em tubos com EDTA para extração de RNA (10 mL) e hemoglobina glicada (5 mL), e em tubos sem anticoagulante (10 mL) para as determinações bioquímicas, antes e após cada fase do tratamento.

As concentrações séricas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérides e glicose foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos. As concentrações séricas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram calculadas (Friedewald *et al.*, 1972). A ALT e a CK foram determinadas por métodos cinéticos no UV. A determinação de PCR ultrasensível, apolipoproteína AI (ApoAI) e apolipoproteína B (ApoB) foram realizadas por nefelometria. A hemoglobina glicada foi medida por HPLC (Geistanger *et al.*, 2008) e a insulina foi determinada por quimioluminescência. Os índices HOMA-IR (*homeostasis model assessment* – resistência à insulina) e HOMA-B (*homeostasis model assessment* – função da célula beta pancreática) foram calculados (Matthews *et al.*, 1985)

As concentrações séricas de TNF- α , MMP-9, MCP-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, PAI-1, sICAM-1, sVCAM-1, e-selectina, adiponectina, resistina e leptina foram determinadas por citometria de fluxo - *Luminex* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

3.3. Obtenção de RNA de células mononucleares

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos indivíduos incluídos no estudo foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque com densidade específica de 1,070 g/mL, à temperatura ambiente. Em resumo, em tubos cônicos de 15 mL de capacidade, foram pipetados 10 mL de sangue com EDTA

(1mg/mL), diluídos com igual volume de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4 e EDTA a 10 mM, pH 8,0), sobre 3 mL de Ficoll-Hypaque. O tubo foi centrifugado a 800 g por 30 min, em temperatura ambiente, recolhendo-se a camada de células mononucleares. As células foram lavadas com tampão Tris-EDTA pH 7,6 e contadas em câmara de Neubauer, e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

O RNA foi extraído de CMSP (5 a 10 x 10⁶ células/mL) utilizando o método de Trizol (Arazi *et al.*, 2008). Resumidamente, as células foram lisadas com trizol que contém fenol e tiocianato de guanidina. O RNA foi separado na fase aquosa e precipitado com isopropanol. Foi, posteriormente, solubilizado em água tratada com DEPC e esterilizada. As amostras de RNA foram armazenadas em temperatura de -80°C.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria no UV utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA), e sua integridade foi avaliada utilizando o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha).

3.4. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

3.4.1. Ensaios de PCR em tempo real

O cDNA foi gerado a partir de 2 µg de RNA, utilizando-se 300 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), transcriptase reversa (RT) 200U (SuperScript™ II RT Rnase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) em 40 µL de volume final. O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA), com as seguintes etapas: 25 °C por 10 min, 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. O cDNA obtido foi diluído para volume final de 40 µL e armazenado a -20 °C até a realização da PCR.

O cDNA de cada gene foi amplificado por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o sistema de detecção TaqMan® (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Os ensaios de qPCR para *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1*, *VCAM1*, *LEP*, *RETN*, *ADIPOR1*, *ADIPOR2* foram selecionados e os dados são mostrados na **tabela 1**.

Para os ensaios qPCR dos genes de interesse, utilizou-se 1 µL de cDNA, iniciadores 900 nM, sonda TaqMan® 250 nM e *Fast Universal® PCR Master Mix* No

AmpErase® UNG (2x) (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) em volume final de 10 µL. Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando o equipamento ABI Prism 7500 Fast (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: um ciclo de 50°C por 2 min, um ciclo de 95°C por 10 min, quarenta ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 60 s.

Os resultados de expressão gênica são expressos em quantificação relativa utilizando os valores de ciclo de amplificação de corte ou *threshold* (C_T) do gene de interesse e de referência. Para essa finalidade, utilizou-se a fórmula: $\Delta C_T = C_T$ gene de interesse – C_T gene de referência (Livak *et al.*, 2001).

Tabela 1: Dados dos ensaios de PCR em tempo real para análise de expressão gênica

Gene	Código do ensaio	Sequência Contexto	Fluoróforo	Produto PCR (pb)
TNFA	Hs99999043_m1	5'-AGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCT-3'	FAM	85
MMP9	Hs00957562_m1	5'-GCACCTCTATGGTCCTCGCCCTGAA-3'	FAM	67
MCP1	Hs00234140_m1	5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAATCAATG-3'	FAM	101
IL1B	Hs01555413_m1	5'-AGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAAA-3'	FAM	136
IL6	Hs00985639_m1	5'-ATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACAT-3'	FAM	66
ICAM1	Hs99999152_m1	5'-TTCGTGTCCTGTATGGCCCCGACT-3'	FAM	99
VCAM1	Hs01003372_m1	5'-TTATGTCAATGTTGCCCCAGAGAT-3'	FAM	62
PAI1	Hs01126604_m1	5'-CCTGGTTCTGCCCAAGTTCTCCCTG-3'	FAM	58
LEP	Hs00174877_m1	5'-TCACACACGCAGTCAGTCTCCTCCA-3'	FAM	74
RETN	Hs00220767_m1	5'-GCCCCGAGGCTTCGCCGTCACCGG-3'	FAM	130
ADIPOR1	Hs00360422_m1	5'-TCGGACTTTTCCAACTGGACTAT-3'	FAM	94
ADIPOR2	Hs01047563_m1	5'-CTCTAGGTTGTGTATTCTTCCTGT-3'	FAM	148

Nota: FAM: fluoróforo 6-carboxifluoresceína.

3.4.2. Eficiência dos ensaios PCR em tempo real

A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um amplicon de PCR foi gerado, geralmente expressa como porcentagem. Se um amplicon de PCR dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação, o ensaio apresenta 100% de eficiência.

A eficiência dos ensaios dos genes de interesse foi avaliada utilizando-se um *pool* de cDNA diluído em série: 1:1 (concentração inicial de 50 ng/µL de RNA total), 1:3, 1:9, 1:27 e 1:81, equivalente as concentrações de RNA/cDNA de 50; 16,7; 5,6; 1,9 e 0,6

ng/ μ L, respectivamente. Cada solução foi testada em triplicata. Foi construída uma curva padrão, na qual os logaritmos das concentrações das soluções de cDNA são plotados contra os valores de C_T correspondentes. Dessa forma é possível obter a relação linear entre o número de cópias de mRNA e os valores de C_T (Kubista *et al.*, 2006; Raymaekers *et al.*, 2009).

A inclinação (*slope*) da curva padrão é usada para estimar a eficiência (E) de amplificação do ensaio da qPCR (Raymaekers *et al.*, 2009), segundo a fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Um *slope* da curva padrão de $-3,32$ indica um ensaio de PCR com 100% de eficiência. O coeficiente de correlação, R^2 , é a medida da relação da proximidade entre duas variáveis, mais especificamente, da relação das proximidades com uma relação linear (Raymaekers *et al.*, 2009).

3.4.3. Seleção do gene de referência

Para estabelecer o gene de referência a ser utilizado nos ensaios de expressão gênica foram testados seis genes constitutivos: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*), hidroximetilbilano sintase (*HMBS*), succinato desidrogenase, subunidade A, (*SDHA*), ubiquitina C (*UBC*), hipoxantinafosforibosiltransferase-1 (*HPRT1*), β -2-microglobulina (*B2M*). As sequências dos iniciadores senso e anti-senso e das sondas estão relacionados na **tabela 2**. Nos ensaios de qPCR dos genes de referência foram utilizadas as mesmas condições que os genes de interesse utilizando iniciadores com concentração final de 300 nM.

Tabela 2: Dados dos genes de referência testados no ensaio de PCR em tempo real

Gene		Sequências dos iniciadores	Produto PCR (pb)
GAPDH	<i>Senso</i>	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'	230
	<i>Anti-senso</i>	5'-CTGGAAGATGGTGTATGGGATTTC-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCAGCCTTGACGGTGC-MGB-NFQ-3'	
HMBS	<i>Senso</i>	5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3'	64
	<i>Anti-senso</i>	5'-GGGTAACCCACGCGAATCAC-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCGGAAGAAAACAGCC-MGB-NFQ-3'	
UBC	<i>Senso</i>	5'-ATTGGGTGCGGTTCTTG-3'	133
	<i>Anti-senso</i>	5'-TGCTTGACATTCTCGATGGT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCGTCACTTGACAATGC-MGB-NFQ-3'	
B2M	<i>Senso</i>	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	86
	<i>Anti-senso</i>	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCTCCACAGGTAGCTCT-MGB-NFQ-3'	
HPRT1	<i>Senso</i>	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	94
	<i>Anti-senso</i>	5'-GGTCCTTTTACCAGGCT-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICCCTTGGTCAGGCAGTAT-MGB-NFQ-3'	
SDHA	<i>Senso</i>	5'-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3'	86
	<i>Anti-senso</i>	5'-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3'	
	<i>Sonda</i>	5'-VICTCCATTCTGCTCAGTATC-MGB-NFQ-3'	

Nota: MGB: *minor groove binder*, NFQ: *non-fluorescent quencher*, VIC: *vaccine-type-specific*, fluoróforo.

Para o teste de seleção do gene de referência, foram selecionadas amostras de RNA com variabilidade de gênero, idade, fase de tratamento, utilização de diferentes tipos de medicamentos e perfil metabólico dos indivíduos (NL, HC e DM2). Os ensaios foram realizados com 5 µL de *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)*, No AmpErase® UNG, iniciadores 300 nM e sonda VIC 250 nM (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), para cada gene de referência testado, em volume final de 10 µL.

Os valores de C_T dos ensaios de curva padrão dos genes de referência foram transformados em valores M, resultante da normalização dos valores de C_T , onde se diminui o valor de cada C_T do menor valor de C_T apresentado no ensaio. O resultado obtido é a potência de 2, utilizado na análise de variabilidade da expressão gênica, utilizando-se o programa GeNorm® (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica).

3.4.4. Controle de qualidade de qPCR

A fim de aumentar a especificidade dos ensaios e evitar a amplificação de sequências inespecíficas foram selecionados ensaios prontos que amplificam regiões de junções éxon-éxon (Raymaekers *et al.* 2009). Para controle dos ensaios qPCR, foram utilizados controles negativos (sem amostra de cDNA), nas placas de amplificação, para averiguação de amplificação inespecífica.

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicata para reduzir a variabilidade dos resultados individuais (Kubista *et al.*, 2006). Os ensaios dos genes de interesse foram realizados em paralelo com o do gene de referência para também diminuir a variabilidade dos resultados (Kubista *et al.*, 2006; Raymaekers *et al.* 2009).

3.5. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa SigmaStat versão 2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos parâmetros laboratoriais, antes e após o tratamento com hipocolesterolemiantes. Para comparar os parâmetros laboratoriais e de expressão de mRNA, entre os grupos NL e HC e entre os grupos HC com e sem diabetes foram utilizados os testes *t*, de Mann-Whitney, ANOVA e *Kruskal Wallis*. Foi considerado o nível de significância $p < 0,05$.

Para avaliar a relação entre a resposta ao hipolipemiante e outros parâmetros, como expressão gênica, os indivíduos HC e DM2 foram agrupados em tercís de redução de LDL-c na primeira fase de tratamento. No grupo DM2, considerou-se a taxa redução de LDL-c na fase de tratamento SE, pois esses indivíduos já estavam em tratamento com sinvastatina. Os tercís do grupo DM2 corresponderam à redução de LDL-c inferior a 22% (T1), entre 23-32% (T2) e superior a 33% (T3). No grupo HC, considerou-se a taxa de redução de LDL-c entre a última fase de tratamento (SE) e a inicial (B). Os tercís do grupo HC corresponderam à redução de LDL-c inferior a 42% (T1), entre 42-55% (T2) e superior a 56% (T3). A representação dos tercís nos grupos DM2 e HC está ilustrada na **figura 3**.

Figura 3. Redução de LDL colesterol, em tercís, após tratamento hipolipemiante. Grupo hipercolesterolêmico (HC): T1:<42%; T2:42-55%; T3: >56%. Grupo diabético (DM2): T1: <22%; T2: 23-32%; T3:>33%.

4. RESULTADOS

4.1. Dados dos participantes do estudo

Foram incluídos 36 indivíduos NL, 37 HC e 47 DM2 que completaram o tratamento farmacológico. Os dados clínicos e as concentrações séricas de lipídios desses indivíduos são mostrados na **tabela 3**.

Os pacientes HC tiveram seus parâmetros bioquímicos dosados antes e após o tratamento medicamentoso. Em pacientes DM2, os parâmetros bioquímicos foram dosados quando os pacientes já faziam uso de sinvastatina (10 ou 20 mg/dia). Esse procedimento ocorreu pelo alto risco que os pacientes DM2 corriam de seus parâmetros aumentarem criticamente ao pararem de utilizar a medicação.

O grupo NL teve menor média de idade e valor de IMC, além de menor número de hipertensos, obesos e mulheres em menopausa que os grupos HC e DM2 ($p<0,05$). O número de mulheres foi menor no grupo DM2 que nos grupos HC e NL ($p=0,022$). Observou-se menor consumo de bebida alcoólica nos indivíduos HC que nos outros grupos ($p=0,004$) (**tabela 3**). Não foram observadas diferenças de frequência de etnia, tabagismo, prática de atividades físicas entre os três grupos estudados ($p>0,05$).

Tabela 3. Características dos indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos

Variável	NL (36)	HC (37)	DM2 (47)	P
Idade, anos	48,4±8,2 [*]	56,2± 9,6	59,6±8,6	<0,001 ^a
Mulheres	75,0%	67,6%	46,8%	0,022
Hipertensão arterial	34,3%	62,1%	59,6%	0,036
Obesidade	2,9%	25,7%	40,0%	<0,001
IMC, kg/m ²	25,1±3,1 ^{**}	27,8±4,7	27,9±5,6	<0,001 ^b
Histórico Familiar de DAC	55,6%	62,2%	75,0%	0,176
Prática de atividade física	47,2%	56,8%	66,7%	0,211
Tabagismo	11,1%	18,9%	10,6%	0,485
Consumo de bebida alcoólica	30,6%	21,6%	55,3%	0,004
Menopausa, sim	40,9%(22)	80,0%(25)	86,4%(22)	0,002
Etnia, brancos	67,6%	70,3%	61,7%	0,485

Nota: NL; normolipidêmicos; HC: hipercolesterolêmicos; DM2: hipercolesterolêmicos e diabéticos; DAC: doença arterial coronariana; IMC: índice de massa corporal. Foram considerados obesos, indivíduos com IMC<30. O consumo de bebida alcoólica foi considerado >2 doses/semana, a prática de exercícios físicos >2 horas semanais. Tabagismo foi considerado consumo de mais de dois cigarros por semana. A etnia foi autodeclarada. A hipertensão foi considerada, quando a pressão sistólica/diastólica foi superior a 140/90mmHg ou quando os indivíduos eram utilizavam antihipertensivos. Os valores estão representados em média ± desvio padrão e as variáveis categóricas foram comparadas por teste qui-quadrado. As variáveis quantitativas foram comparadas por comparados por ^aANOVA, ^bANOVA *on Ranks* médias HC e DM2 são significativamente diferentes da média NL, comparadas pelo teste de *Turkey*. ^{**} médias HC e DM2 são significativamente diferentes da média NL, comparadas pelo teste de Dunn.

O perfil lipídico na fase basal do grupo HC foi comparado com o perfil lipídico do grupo NL (**tabela 4**). Todos os parâmetros foram maiores no grupo HC, em relação ao grupo NL ($p<0,001$), com exceção do HDL colesterol que não diferiu ($p>0,05$). Na **figura 4**, é ilustrado o perfil lipídico dos pacientes do grupo HC e a comparação entre as fases de tratamento (A) e a comparação da fase basal do grupo HC e o grupo NL quanto ao mesmo perfil (B).

Figura 4. Comparação do perfil lipídico dos grupos NL e HC (A) e perfil lipídico do grupo HC (B). Os valores estão representados em média e erro padrão. * $p < 0,05$. ** médias não diferentes entre si.

No grupo HC, a ezetimiba reduziu as concentrações de colesterol total (15,5%), LDL-c (21,0%), triglicérides e VLDL-c (11,0%) e apo B (15,8%) comparado com a fase basal ($p < 0,05$) (**Tabela 4**). Na fase S, houve redução de colesterol total (23,1%), LDL-c (31,8%), triglicérides e VLDL-c (14,4%) e apoB (25,8%) também comparado com a fase basal ($p < 0,05$). O tratamento SE reduziu em mais de 33,0% as concentrações de colesterol total e 46,0% de LDL-c e 37,5% de apoB, em comparação com os valores basais ($p < 0,05$). Já as concentrações de triglicérides e VLDL-c sofreram redução de 22,0% após a terapia combinada ($p < 0,05$). As concentrações séricas de HDL colesterol e apoAI não foram afetadas pelo tratamento com sinvastatina isolada ou em combinação com ezetimiba ($p > 0,05$), no grupo HC.

Tabela 4. Perfil lipídico de hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com hipolipemiantes

Variável (mg/dL)	NL	HC				p1	p2
		B	E	S	SE		
CT	173±18	264±29 ¹	223±31 ²	203±31 ³	176±35 ⁴	<0,001 ^a	<0,001 ^c
HDL-c	55±13	59±13	59±10	58±13	57±12	0,727 ^b	0,154 ^c
LDL-c	101±17	176±26 ⁵	139±28 ^{6¥}	120±27 ^{7¥}	95±29 ⁸	<0,001 ^b	<0,001 ^c
VLDL-c	17±6	29±12 ⁵	26±11	25±9	23±11 ⁶	0,030 ^b	<0,001 ^c
TG	87±30	146±58 ⁵	130±55	125±45	114±52 ⁶	0,046 ^b	<0,001 ^c
ApoAI	140±30	145±23	145±22	144±29	145±20	0,848 ^b	<0,001 ^c
ApoB	80±20	120±19 ⁵	101±21 ⁶	89±17 ^{7¥}	75±19 ^{8¥}	<0,001 ^b	<0,001 ^d

Nota. NL; normolipidêmicos; HC: hipercolesterolêmicos; CT: colesterol total; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; E: ezetimiba (10mg/dia/4semanas); S: sinvastatina (10mg/dia/8semanas); SE: associação de ezetimibe e sinvastatina (10mg+10mg/dia/4semanas). Os valores estão representados em média ± desvio padrão e foram comparados por ^aANOVA, ^bKruskal Wallis ANOVA, ^cMann Whitney test ^dteste t. Números diferentes na mesma linha indicam médias significativamente diferentes entre si, comparadas por ¹⁻⁴teste de Turkey e ⁵⁻⁸pelo teste de Dunn, [¥]médias não diferentes entre si. p: p-valor, p1: comparação do perfil lipídico entre cada uma das fases de tratamento no grupo HC, p2: comparação da fase basal do perfil lipídico do grupo HC com o perfil lipídico do grupo NL.

Na **tabela 5**, é apresentada a comparação do perfil lipídico do grupo DM2 total e separados por dose de sinvastatina (10 mg e 20mg/dia). No grupo DM2 total, o tratamento SE reduziu o colesterol total em 14,7%, LDL-c em 23,7%, e ApoB em 14,8% (p<0,001). Houve também redução de triglicérides e VLDL-c em 12,7% (p<0,05). Essas reduções nos lipídeos séricos foram similares às do grupo tratado com 20 mg de sinvastatina, mas no grupo tratado com 10 mg sinvastatina não se observou redução de triglicérides e VLDL-c. As concentrações de HDL-c e apoAI não foram influenciadas pelo tratamento SE.

Na **figura 5**, o perfil lipídico dos pacientes DM2 foi comparado em relação à fase de tratamento, no grupo total e dose de sinvastatina administrada na fase inicial.

Tabela 5. Perfil lipídico de diabéticos tratados com hipolipemiantes

Variável (mg/dL)	DM2 total			DM2 S10			DM2 S20		
	S	SE	<i>p</i>	S	SE	<i>p</i>	S	SE	<i>p</i>
CT	170±35	145±28	<0,001 ^a	171±36	143±30	<0,001 ^a	169±34	148±26	0,005 ^b
HDL-c	51±15	51±15	0,894 ^a	53±14	52±16	0,858 ^a	49±16	50±14	0,312 ^b
LDL-c	93±25	71±27	<0,001 ^a	94±23	69±30	<0,001 ^a	92±26	73±23	<0,001 ^a
VLDL-c	31±19	26±13	0,006 ^b	30±21	27±16	0,088 ^b	31±16	24±10	0,013 ^a
TG	142±71	124±57	0,022 ^b	129±58	125±63	0,596 ^b	155±82	122±50	0,013 ^a
Apo AI	142±27	143±26	0,575 ^b	147±30	143±28	0,321 ^a	138±22	142±24	0,064 ^b
Apo B	81±23	69±25	<0,001 ^a	80±26	68±28	<0,001 ^a	82±19	70±20	0,001 ^a

Nota. DM2: hipercolesterolêmicos e diabéticos; CT: colesterol total; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; sinva: sinvastatina; SE: associação de ezetimibe e sinvastatina (10mg+10mg/dia/4semanas). Os valores estão representados em média ± desvio padrão e foram comparados por ^ateste t pareado ^bWilcoxon Signed Rank Test.

Figura 5. Concentrações plasmáticas de CT, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, TG, ApoAI e ApoB em indivíduos DM2. Os valores estão representados em média e erro padrão. * $p < 0,05$.

Dados do perfil glicêmico de indivíduos DM2 estão descritos na **tabela 6**. Foram analisados a glicose de jejum, insulina, hemoglobina glicada, HOMA-IR e HOMA-B. Não foram observadas diferenças nesses parâmetros no grupo DM2, após o tratamento de associação com ezetimiba ($p > 0,05$). Na **figura 6**, está ilustrado o perfil glicêmico dos indivíduos DM2 antes e após terapia de associação com ezetimiba e separados por dose inicial de sinvastatina.

Tabela 6. Perfil glicêmico de diabéticos tratados com hipolipemiantes

Variável	DM2 total		<i>p</i>	DM2 S10		<i>p</i>	DM2 S20		<i>p</i>
	S	SE		S	SE		S	SE	
Glicose (mg/dL)	115±30	117±29	0,391 ^a	122±29	120±29	0,694 ^b	124±32	121±29	0,202 ^a
Insulina (mUI/L)	9±7	10±9	0,385 ^a	10±6	11±6	0,309 ^b	12±9	13±12	0,768 ^a
Hb1AC (%)	6±1	6±1	0,676 ^b	7±1	7±1	0,574 ^b	7±1	7±1	0,919 ^b
HOMA-IR	3±2	3±3	0,506 ^a	3±2	4±2	0,501 ^b	3±3	4±3	0,677 ^a
HOMA-B	55±57	69±80	0,506 ^a	72±43	78±38	0,786 ^b	90±70	99±105	0,555 ^a

Nota. Hb1AC: hemoglobina glicada; sinvastatina 10mg/dia/4semanas (S10), sinvastatina 20mg/dia/4semanas (S20); SE: associação de ezetimiba e sinvastatina (10mg+10mg/dia/4semanas). Os valores estão representados em média ± desvio padrão, e foram comparados por ^a Wilcoxon Signed Rank Test ^b teste-t pareado.

Figura 6. Comparação do perfil glicêmico dos pacientes do grupo DM2, ilustrando as concentrações plasmáticas de glicose de jejum (GLI), insulina (INS), hemoglobina glicada (Hb1AC), HOMA-IR e HOMA-B em indivíduos DM2. Os valores estão representados em média e erro padrão.

4.2. Perfil inflamatório e de adesão

Os analitos TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, MMP-9, MCP-1, sICAM1, sVCAM1, e-selectina, PAI-1, leptina, resistina, adiponectina e PCRus foram dosados para avaliação do perfil inflamatório e de adesão dos pacientes HC, como apresentado nas **figuras 7 a 9**. Observa-se que na fase SE houve redução na concentração de adiponectina em comparação com o basal (B) e as monoterapias ($p < 0,001$) (**Figura 9**), mas as concentrações dos demais analitos não diferiram entre as fases de tratamento com hipolipemiantes ($p > 0,05$).

Figura 7. Comparação das concentrações plasmáticas de TNF- α , MMP-9, MCP-1, IL1 β , IL-6, IL-8 nas fases de tratamento em pacientes HC. Os valores estão representados em média e erro padrão e foram comparados por ^aANOVA e ^bKruskal Wallis.

Figura 8. Comparação das concentrações plasmáticas de sICAM1, sVCAM1, e-selectina e PAI-1 nas fases de tratamento em pacientes HC. Os valores estão representados em média e erro padrão e foram comparados por ^aANOVA e ^bKruskal Wallis.

Figura 9. Comparação das concentrações plasmáticas de leptina, resistina, adiponectina e PCRus nas fases de tratamento em pacientes HC. Os valores estão representados em média e erro padrão e foram comparados por *Kruskal Wallis*.

No grupo DM2, foram determinados os analitos adiponectina, resistina, e-selectina, sICAM1, sVCAM1, MMP-9 e PRCus (**figura 10**). A concentração plasmática de adiponectina foi reduzida da fase S para a SE, no grupo total ($p=0,041$) e no grupo S20 ($p=0,016$). A concentração de sICAM1 foi aumentada da fase S para SE, no grupo total ($p=0,017$) e S10 ($p=0,021$). A concentração de sVCAM1 reduziu da fase S para SE, no grupo total ($p=0,014$), mas aumentou no grupo S10 ($p<0,001$). A e-selectina teve comportamento similar a de sVCAM1, mas no grupo S20 teve redução ($p=0,013$). A PCR ultrasensível teve redução em todos os grupos ($P<0,001$). Os resistina e MMP-9 não se alteraram ($p>0,05$).

Figura 10. Comparação das concentrações plasmáticas do perfil inflamatório nas fases de tratamento em pacientes DM2 no grupo total, dose inicial de sinvastatina de 10 (S10) e de 20mg/dia (S20). Os valores estão representados em média e erro padrão e foram comparados por ^aWilcoxon Signed Ranked Test e ^bteste-t pareado.

4.3. Resultados de expressão de mRNA em CMSP

4.3.1. Gene de referência

Na **figura 11**, são apresentados os valores M dos seis genes constitutivos (*GAPDH*, *HMBS*, *SDHA*, *UBC*, *HPRT1* e *B2M*) obtidos por cálculo utilizando-se o programa GeNorm[®]. Os menores valores M indicam maior estabilidade do gene, no modelo celular (CMSP) e nas condições experimentais estudadas (pacientes com e sem tratamento com sinvastatina e ezetimiba). Os genes *UBC* e *B2M* foram os mais estáveis, tendo sido selecionado o gene *UBC* para ser utilizado como referência.

Figura 11. Valor de estabilidade (M) de expressão dos genes de referência, em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos, diabéticos e normolipidêmicos.

4.3.2. Eficiência dos ensaios de qPCR

Os ensaios de qPCR para análise de expressão de RNAm, em CMSP, foram otimizados para cada um dos genes estudados. As curvas-padrão foram construídas com os dados de concentrações de RNA/cDNA (50; 16,7; 5,6; 1,9 e 0,6 ng/μL) plotados contra os valores de C_T correspondentes. Na **figura 12**, estão representadas as curvas de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL1B*, *ICAM1* e *IL6*. A curva padrão de *TNFA* apresentou um *slope* de -3,142, que resultou no valor de eficiência de 108,1% e R^2 de 0,993. A curva padrão de *MMP9* apresentou um *slope* de -3,553, que resultou num valor de eficiência de 91,1% e R^2 de 0,976. Para *MCP1*, a curva apresentou um *slope* de -3,171, eficiência de 106,7% e R^2 0,986. A curva padrão de *IL1B* apresentou um *slope* de -3,485, eficiência de 93,6% e R^2 0,992. A curva padrão de *ICAM1* apresentou um *slope* de -2,707, eficiência de 134,1% e R^2 0,991. A curva padrão de *IL6* apresentou um *slope* -3,171, uma eficiência de 106,7% e R^2 :0,986.

Figura 12. Curva padrão para expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL1B*, *ICAM1* e *IL6* em CMSP. Dados da curva, para *TNFA*: *slope* -3,142; Eficiência:108,1%; R^2 :0,993. Para *MMP9*: *slope*: -3,553; Eficiência: 91,1%; R^2 0,976. Para *MCP1*: *slope* -2,989; Eficiência:116,1%; R^2 :0,991. Para *IL1B*: *slope*: -3,485; Eficiência: 93,6%; R^2 0,992. Para *ICAM1*: *slope*: -2,707; Eficiência: 134,1%; R^2 : 0,991. Para *IL6*: *slope* -3,171; Eficiência:106,7%; R^2 :0,986.

As curvas dos genes *VCAM1*, *RETN*, *PAI1*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* estão ilustradas na **figura 13**. A curva padrão de *VCAM1* apresentou um *slope* de -3,380, eficiência de 97,6% e R^2 0,932. Para *RETN*, a curva apresentou um *slope* de -3,167, eficiência de 106,9% e R^2 0,988. Os dados da curva de *PAI1* foram -3,286 de *slope*, eficiência de 101,5% e R^2 0,985. A curva padrão de *LEP* teve *slope* de -2,235, eficiência 180,1% e R^2 0,992. Os dados da curva de *ADIPOR1* foram -2,867 de *slope*, 123,3% de eficiência e 0,992 R^2 . O *slope* da curva de *ADIPOR2* foi de -3,122, eficiência de 109,1% e R^2 0,991.

A eficiência dos dois ensaios de qPCR pois deve variar de 90 a 110% (Livak, 2001; Life Technologies, 2011). Dessa forma, os ensaios de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL1B*, *IL6*, *RETN*, *PAI1* e *ADIPOR2* estão adequadamente dentro do esperado.

Figura 13. Curva padrão para expressão de *VCAM1*, *RETN*, *PAI1*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP. Dados da curva, para *VCAM1*: slope -3,380; Eficiência:97,6%; R^2 :0,932. Para *RETN*: slope: -3,167; Eficiência: 106,9%; R^2 0,988. Para *PAI1*: slope -3,386; Eficiência:101,5%; R^2 :0,985. Para *ADIPOR1*: slope: -2,867; Eficiência: 123,3%; R^2 0,992. Para *LEP*: slope: -2,235; Eficiência: 180,1%; R^2 : 0,992. Para *ADIPOR2*: slope -3,122; Eficiência:109,1%; R^2 :0,991.

4.3.3. Resultados de expressão de mRNA

A expressão de mRNA relativa de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL6*, *IL1B*, *ICAM1*, *VCAM1*, *RETN*, *PAI1*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foi analisada, em CMSP, de 36 indivíduos NL e 37 indivíduos HC cujos resultados estão ilustrados nas **figuras 14 e 15**. Foi observado que o grupo HC tem maior expressão de *IL6* ($p=0,044$) e menor expressão de *IL1B* ($p<0,001$) comparado ao grupo NL. A expressão de mRNA nos outros genes não foi diferente entre os dois grupos estudados ($p>0,05$). No grupo HC, a expressão desses genes não diferiu entre o basal e as fases E, S ou SE ($p>0,05$) (**figuras 16 e 17**).

Figura 14. Comparação da expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP dos grupos normolipidêmico (NL) e hipercolesterolêmico (HC). Os valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta CT = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ UBC}$), estão representados por medianas, e foram comparados por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

Figura 15. Comparação da expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP dos grupos normolipidêmico (NL) e hipercolesterolêmico (HC). Os valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta CT = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ UBC}$), estão representados por medianas, e foram comparados por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

Figura 16. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP de indivíduos HC. Os valores de expressão de mRNA relativa ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ UBC}$), estão representados por medianas, e foram comparados entre as fases Basal (B), ezetimiba (E), sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), por *Kruskal-Wallis One Way*.

Figura 17. Expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP de indivíduos HC. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ UBC}$), estão representados por medianas, e foram comparados entre as fases Basal (B), ezetimiba (E), sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), por *Kruskal-Wallis One Way*.

Com a finalidade de avaliar a relação do perfil de resposta à ezetimiba com a expressão de mRNA, os indivíduos grupo HC foram separados por tercís de valor de redução de LDL colesterol: T1 < 42% (menor resposta); T2 42-55%; e T3 > 56% (maior resposta). Foram comparados os resultados de expressão de mRNA entre os HC com menor resposta (T1) e maior resposta (T3) de LDL colesterol e também cada grupo de tercil entre as fases de tratamento. Apenas a expressão de *IL6* em CMSP de HC, variou entre a fase ezetimiba entre os tercís 1 e 3 ($p=0,044$). Para os outros genes testados, não houve variação na expressão em ambos os grupos de maior (T3) e menor (T1) resposta de LDL colesterol à ezetimiba, como apresentado nas **figuras 18 e 19**.

Figura 18. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP de indivíduos HC. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ gene UBC}$) estão representados por medianas, e foram comparados entre as fases Basal (B), ezetimiba (E), sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), por *Kruskal-Wallis One Way*. T1: redução de LDL-c inferior a 41,5%. T3: redução de LDL-c superior a 55%.

Figura 19. Expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP de indivíduos HC. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ gene UBC}$) das fases basal (B), ezetimimibe (E), sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimimibe (SE) foram comparados entre si por teste t pareado. T1: redução de LDL-c inferior a 41,5%. T3: redução de LDL-c superior a 55%.

Nas **figuras 20 e 21**, está ilustrada a expressão relativa de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* testados em CMSP de 47 indivíduos DM2. Houve redução na expressão de mRNA de *MMP9* da fase S para a SE ($p = 0,043$) (**Figura 20**), mas os demais genes tiveram sua expressão inalterada ($p > 0,05$).

Figura 20. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP de indivíduos DM2 nas fases S e SE. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ gene UBC}$) das fases sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimimibe (SE), representados por mediana, foram comparados entre si por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

Figura 21. Expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP de indivíduos DM2 nas fases S e SE. Os valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta CT = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) das fases sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), representados por mediana, foram comparados entre si por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

O grupo DM2 foi separado entre aqueles que utilizaram 10 ou 20mg de sinvastatina pelo período de quatro semanas. A comparação entre as fases de tratamento estão ilustradas nas **figuras 22 e 23**. Na fase S, foi observada maior expressão de *PAI1*, *ICAM1*, *RETN* e *ADIPOR1* no grupo S20 que no grupo S10 ($p < 0,05$). Por outro lado, na fase SE, a expressão de *IL6* foi menor no grupo S20 que no grupo S10.

Figura 22. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP de indivíduos DM2 nas fases sinvastatina 10mg (S10), sinvastatina 20mg (S20) e sinvastatina e ezetimiba (SE). Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) Os valores estão representados em mediana e foram comparados entre si por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

Figura 23. Expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP de indivíduos DM2 nas fases sinvastatina 10mg (S10), sinvastatina 20mg (S20) e sinvastatina e ezetimiba (SE). Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) Os valores estão representados em mediana e foram comparados entre si por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

Os indivíduos DM2 foram divididos em tercís de resposta da fase SE comparada com a fase S. Foram selecionados os tercís de menor redução de LDL colesterol (T1<22%) e maior redução (T3>33%). A expressão de mRNA de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *IL1B*,

ICAM1 e *IL6*, em CMSP, não diferiram entre os tratamentos para os dois tercís selecionados (**figura 24**).

O tratamento com SE também não modificou a expressão de mRNA de *VCAM1*, *RETN*, *PAI1*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, em CMSP do grupo DM2 com menor (T1) ou maior (T3) resposta de LDL colesterol (**figura 25**). Entretanto, na fase S, observa-se que a expressão de *ADIPOR1* e de *LEP* é menor no grupo T3 (maior resposta) que no grupo T1 (menor resposta) ($p < 0,05$). Na fase SE, a expressão de *LEP* se mantém menor no grupo T3 que no grupo T1 ($p = 0,016$).

Figura 24. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP de indivíduos DM2. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T \text{ gene interesse} - C_T \text{ gene UBC}$) estão representados por medianas e foram comparadas entre as fases sinva e SE pelo teste ^aWilcoxon Signed Rank Test ^bteste-t pareado. A comparação entre os tercís foi feita pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum*. T1: redução de LDL-c inferior a 20%. T3: redução de LDL-c superior a 30%. Ver comentários anteriores

Figura 25. Expressão de *VCAM1*, *RETN*, *PAI1*, *ADIPOR1*, *LEP* e *ADIPOR2* em CMSP de indivíduos DM2. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) estão representados por medianas e foram comparadas entre as fases sinva e SE pelo teste ^aWilcoxon Signed Rank Test ^bteste-t pareado. A comparação entre os tercis foi feita pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum*. T1: redução de LDL-c inferior a 20%. T3: redução de LDL-c superior a 30%. Ver comentários anteriores

Nas **figuras 26 e 27**, estão ilustradas as comparações da expressão de mRNA, em CMSP, das fases S e SE entre os grupos HC e DM2. Foi observado que o grupo DM2 possui maior expressão de *PAI1* e *VCAM1* (**Figura 26**) e de *RETN*, *LEP* e *ADIPOR2* (**Figura 27**) que o grupo HC, nas fases S e SE ($p < 0,05$). A expressão de *ADIPOR1* foi maior no grupo DM2 que no HC sé na fase SE ($p = 0,016$).

Figura 26. Expressão de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1* e *VCAM1* em CMSP do grupo HC comparados com o grupo DM2. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) estão representados por medianas, e foram comparados entre as fases sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), por *Mann Whitney*.

Figura 27. Expressão de *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP do grupo HC comparados com o grupo DM2. Os valores de expressão ($2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = C_T$ gene interesse – C_T gene UBC) estão representados por medianas, e foram comparados entre as fases sinvastatina (S) e sinvastatina e ezetimiba (SE), por *Mann Whitney*.

5. DISCUSSÃO

Como o esperado, indivíduos hipercolesterolêmicos e DM2 apresentam dados que indicam maior risco cardiovascular, como maior frequência de hipertensão arterial e obesidade, além de maior idade e IMC, em comparação com o grupo NL. O número de mulheres foi menor no grupo DM2, e a frequência de menopausa foi menor no grupo NL. O consumo de bebida alcoólica também foi maior no grupo DM2.

Estudos como *The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications* (DCCT/EDIC 1 a 3), *QRisk 1 e 2*, *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), *Cleveland Study* e *Sweden Study* demonstram a relação entre a diabetes e a hipercolesterolemia, e o risco cardiovascular, identificando a idade, o sexo, o tabagismo, circunferência abdominal, anos do diagnóstico de diabetes, porcentagem de hemoglobina glicada, perfil lipídico, hipertensão, taxa de excreção de albumina, como fatores de risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (Lagani *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2012; Nazer *et al.*, 2012).

Dessa forma, alguns dos fatores de risco, como sobrepeso/obesidade, tabagismo, perfil lipídico elevado, hipertensão poderiam ser reduzidos com mudanças nos hábitos alimentares, prática de exercícios físicos, e evitando o tabagismo (Pounis *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2012; Kokkinos, 2012). Quando não puderem ser revertidos, a terapia medicamentosa deverá ser implementada para o tratamento da hipercolesterolemia e controle da glicemia (Kennedy *et al.*, 2012; Robinson, 2012).

Ao comparar o perfil lipídico do grupo NL com o grupo HC, todos os parâmetros estavam aumentados no grupo HC, com exceção do HDL-c e apo AI, que não diferiram. Os percentuais de redução LDL colesterol após os tratamentos do grupo HC com a ezetimiba (21%), sinvastatina (31,8%) e sinvastatina e ezetimiba (46%) foram similares aos descritos na literatura, mesmo quando esses estudos apresentavam tempo de tratamento diferentes (entre 3 e 22 semanas) (Krysiak *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

No estudo ACTII, que estudou indivíduos hipercolesterolêmicos com e sem diabetes tratada com estatinas (sinvastatina, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina) e associação ezetimiba e sinvastatina (10/10, 10/20, 10/40, 10/80), foi relatada redução de LDL colesterol (31%) pós-tratamento com sinvastatina

independente da dose (Eber *et al.*, 2012), comparável com a observada neste estudo para o grupo HC.

A monoterapia com 40mg de sinvastatina por 8 semanas reduziu em 17,9% o LDL colesterol, em pacientes hipercolesterolêmicos (Yu *et al.*, 2012). Doses entre 20 e 80mg de sinvastatina por 36 semanas apresentaram redução no LDL colesterol de 33,8% em indivíduos hipercolesterolêmicos com e sem diabetes (Friedman *et al.*, 2011). Em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com 40mg de sinvastatina por 12 semanas, houve redução de 34% no LDL colesterol e, após associação com 10mg de ezetimiba, houve redução de 45% no LDL colesterol (Krysiak *et al.*, 2011).

A associação de ezetimiba (10 mg) no tratamento com estatinas (20mg sinvastatina, 10 mg atorvastatina ou 20mg de pravastatina) por 8 semanas reduziu em 26,8% o LDL colesterol (Yu *et al.*, 2012). A associação de ezetimiba e sinvastatina (20 e 80mg) por 36 semanas em pacientes hipercolesterolêmicos com e sem diabetes reduziram o LDL colesterol em 44,2% (Friedman *et al.*, 2011).

Neste estudo foi observado que a sinvastatina e a ezetimiba, em monoterapia ou associação, foram capazes de reduzir as concentrações de LDL colesterol, em hipercolesterolêmicos. Ademais, os percentuais de redução do LDL colesterol nessa população parecem estar relacionados com o tempo de tratamento e com a dose de sinvastatina utilizada.

Para o grupo DM2, a associação de ezetimiba com sinvastatina resultou em 23,7% de redução de LDL colesterol, comparado com a concentração de LDL colesterol durante o tratamento com sinvastatina 10 ou 20 mg/dia. Após 6 semanas sem medicação, a associação de 10 mg de ezetimiba com 20mg de sinvastatina por 12 meses em indivíduos diabéticos reduziu as concentrações de LDL colesterol em 28,7% (Rotella *et al.*, 2011). Indivíduos diabéticos tratados com sinvastatina e ezetimiba (10mg/cada) por 12 semanas tiveram redução de 19,4% no LDL colesterol (Kishimoto *et al.*, 2011).

O grupo DM2 que fazia uso de 20mg de sinvastatina/dia, ao ser tratado com ezetimiba (10 mg/dia) associada com a sinvastatina (10mg/dia) teve redução também de triglicérides e VLDL colesterol, o que não foi observado no grupo que recebia 10mg/dia sinvastatina.

Estudos mostraram que a dose de sinvastatina e a associação com ezetimiba dependentes da dose influem na redução de LDL colesterol, em diabéticos. No estudo

de Heintjes e colaboradores, pacientes diabéticos tratados com diferentes doses e tipos de estatinas (sinvastatina, pravastatina, atorvastatina e rosuvastatina entre 10-80mg) tiveram reduções maior que 30% somente no LDL colesterol (Heintjes *et al.*, 2012). No estudo de Slany, com pacientes diabéticos tratados por 12 semanas, foi observado que a associação de ezetimiba e sinvastatina (10/10, 10/20 10/40 mg), em relação a monoterapia, promoveu redução mais acentuada não só de LDL colesterol (28,8%, 29,6% e 35,1% respectivamente), mas também de triglicérides (11,3%, 13,9% e 17,7%, respectivamente) (Slany, 2009).

Foi demonstrado que em indivíduos diabéticos e hipercolesterolêmicos, a associação de sinvastatina com ezetimiba resulta em maior redução nas concentrações de LDL colesterol, e que as doses de sinvastatina antes da associação, também influi no percentual de redução deste parâmetro e de triglicérides. Da mesma forma que nos indivíduos não diabéticos estudados neste trabalho, as maiores reduções percentuais parecem estar relacionadas com o tempo de tratamento.

Com relação ao perfil glicêmico do grupo DM2, observou-se que a associação sinvastatina e ezetimiba não modificou a glicemia, insulina e a hemoglobina glicada, em comparação com a monoterapia com sinvastatina, independente da dose (10 ou 20mg/dia). Em pacientes hipercolesterolêmicos não diabéticos, o tratados com 40mg sinvastatina por 12 semanas não houve alteração na glicose de jejum, pós carga de glicose e HOMA-IR (Krysiak *et al.*, 2011). Em outro estudo com pacientes hipercolesterolêmicos não diabéticos tratados com 40 mg de sinvastatina, e associação de sinvastatina e ezetimiba (10+10mg) por 2 semanas, não houve mudanças nas concentrações de glicose de jejum, HOMA-B e insulina (Berthold *et al.*, 2012). No trabalho de Moutzouri e cols, também em não diabéticos, tratados com 40 mg de sinvastatina, e associação de sinvastatina e ezetimiba (10+10mg) por 2 semanas tiveram a insulinemia de jejum e a HOMA-IR diminuídas após cada um dos tratamentos (Moutzouri *et al.*, 2011).

Os resultados encontrados confrontados com os dados da literatura indivíduos hipercolesterolêmicos, diabéticos ou não, sobre o perfil glicêmico foram controversos. A utilização da sinvastatina e a introdução da ezetimiba não pareceu afetar os parâmetros do perfil glicêmico dos diabéticos.

Neste estudo, as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, MMP-9, MCP-1, PAI-1, leptina, resistina, adiponectina e PCRus, e moléculas de adesão, sICAM1,

sVCAM1, e-selectina não foram alteradas pelos tratamentos hipolipemiantes, no grupo HC. Indivíduos hipercolesterolêmicos tratados por 2 semanas com 10mg de ezetimiba, 40mg de sinvastina ou associação de ambos (10/40mg) também não apresentaram diferenças nas concentrações de adiponectina, leptina e resistina (Gouni-Berthold *et al.*, 2008).

Outros estudos descreveram efeitos de estatinas e ezetimiba sobre alguns marcadores inflamatórios. Indivíduos hipercolesterolêmicos e não diabéticos tratados com sinvastatina (40 mg/dia) por 12 semanas e associação com ezetimiba (10mg/dia) por mais 12 semanas, apresentaram redução de PCRus, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1 após ambos os tratamentos em 12 semanas (Krysiak *et al.*, 2011 – B). Também foi relatado que indivíduos hipercolesterolêmicos com e sem diabetes tratados por 12 semanas com diferentes doses de estatinas (rosuvastatina, atorvastatina, pravastatina e pitavastatina) e 10 mg de ezetimiba não tiveram as concentrações de PCRus, adiponectina e leptina alteradas em nenhuma das fases, mas as concentrações de TNF- α foram reduzidas no tratamento com a ezetimiba apenas (Tobaru *et al.*, 2011).

Não foi demonstrado efeito da sinvastatina ou da ezetimiba sobre as concentrações plasmáticas neste estudo. Os trabalhos que apresentaram alterações com tempo de tratamento e doses maiores de sinvastatina, e em populações mais heterogêneas.

Curiosamente, no grupo HC, a concentração plasmática de adiponectina foi reduzida após o tratamento combinado sinvastatina (10mg) e ezetimiba (10mg), mas não com as monoterapias. Esse resultado corrobora os do estudo de Koh e colaboradores que descreveram redução da adiponectinemia, mas não de PCRus, em pacientes hipercolesterolêmicos que utilizaram sinvastatina (10, 20, 40 e 80 mg) por 8 semanas, independente da dose (Koh *et al.*, 2008). Em indivíduos hipercolesterolêmicos randomizados para o tratamento de 45mg de pioglitazona, 40mg de sinvastatina e associação entre ambas (45+40mg) por 12 semanas, foi observado que as concentrações de adiponectina foram reduzidas somente após a monoterapia com sinvastatina, mas foram elevadas com a pioglitazona em monoterapia e associada com sinvastatina (Forst *et al.*, 2007). Isso é sugestivo de um potencial efeito inibitório da sinvastatina e da ezetimiba sobre a produção e liberação adiponectina no plasma. Por outro lado, em cultura de adipócitos 3T3 L1 estimulados com TNF- α , a sinvastatina

(10 μ M) aumentou secreção de adiponectina e PAI-1, reduziu a secreção de MCP-1, (Lobo *et al.*, 2012).

Neste estudo, a expressão de mRNA de *TNFA*, *MMP9*, *MCP1*, *PAI1*, *ICAM1*, *VCAM1*, *IL6*, *IL1B*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em CMSP foi similar entre indivíduos dos grupos HC e NL. Por outro lado, em pacientes HC, a expressão *IL6* foi maior de *IL1B* menor quando comparados com os indivíduos do grupo NL.

A expressão aumentada de *IL6* em indivíduos hipercolesterolêmicos pode estar relacionada com o perfil inflamatório de baixo grau, aumentado nestes indivíduos em relação aos indivíduos NL (Alenxandraki, 2010). A maior expressão de *IL1B* pode ocorrer em condições inflamatórias gerais, como febre, artrite, gastrite (Dinarelllo, 2011), em normolipidêmicos pode ser explicada pela não utilização de medicamentos que poderiam influir na expressão desse gene (Koh *et al.*, 2005).

O tratamento com hipolipemiantes não modificou a expressão de mRNA média dos genes estudados em pacientes HC. Entretanto, quando os pacientes HC foram agrupados por tercís de redução de LDL colesterol, observou-se que os pacientes com maior resposta (maior redução de LDL colesterol) tinham maior expressão de *IL6* durante o tratamento com 10mg de sinvastatina por 8 semanas. Em estudo recente que utilizou a tecnologia de microarranjos de DNA, foi demonstrada redução na expressão de mRNA de *IL6*, *MPC1* e *PAI1*, em cultura de linfócitos tratados com 5mg de atorvastatina por 24h (Wang *et al.*, 2012).

Os achados no presente estudo foram divergentes quanto à expressão de *IL6* em cultura de linfócitos, primeiramente pelo diferente tipo de células utilizadas nos experimentos e, além da linhagem, o tipo de estatina utilizada também foi diferente. Aparentemente, o tratamento com a ezetimiba foi a responsável pelo aumento da expressão de *IL6* observada, mas mais estudos deverão ser realizados.

As concentrações plasmáticas de adiponectina e PCRus foram reduzidas da fase S para fase SE. A redução na adiponectina também foi observada no grupo HC e em trabalhos anteriores com pacientes hipercolesterolêmicos não diabéticos, como já citados acima (Koh *et al.*, 2008; Forst *et al.*, 2007).

Em pacientes hipercolesterolêmicos diabéticos ou não, que utilizavam 10mg de sinvastatina a pelo menos 6 meses, foram orientados a utilizar 20mg de pravastatina por 6 meses. Houve redução nas concentrações de PCRus, mas adiponectina foi aumentada. (Kai *et al.*, 2008). Por outro lado, em homens com síndrome metabólica,

tratados com 80mg de sinvastatina ou associação de 10mg de sinvastatina e 10mg de ezetimiba por 6 semanas não houve redução das concentrações plasmáticas de adiponectina (Hajer *et al.*, 2008).

Neste estudo, a associação de sinvastatina com ezetimiba foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de PCRus em diabéticos, resultado encontrado na literatura, o que indica que ambos utilizados concomitantemente tem um papel inflamatório importante nesses indivíduos. De outra forma, a adiponectina representa um resultado controverso e discutível, que precisará ser estudado e aprofundado isoladamente.

Neste trabalho, as concentrações de sICAM-1 foram aumentadas e de sVCAM-1 e e-selectina foram reduzidas, no grupo DM2, na fase da associação sinvastatina e ezetimiba, mas essas diferenças foram dependentes da dose de sinvastatina na fase de monoterapia. Em pacientes com histórico de doença isquêmica coronária tratados por 12 semanas com 20mg de atorvastatina foi mostrada redução nas concentrações plasmáticas de sICAM-1, sVCAM-1 e e-selectina (Bolewski *et al.*, 2008). Em pacientes diabéticos e hipercolesterolêmicos tratados com 2mg/dia de pitavastatina por 24 semanas tiveram redução na concentração de e-selectina, aumento de adiponectina e MCP-1 sem alteração de (Nomura *et al.*, 2008). Por outro lado, em pacientes hipercolesterolêmicos com e sem diabetes tratados por 4 semanas com 10mg de atorvastatina, não houve alteração nas concentrações plasmáticas de e-selectina e MCP-1 (Bláha *et al.*, 2006). Esses resultados são sugestivos de que a produção e liberação dessas moléculas de adesão são diferencialmente moduladas pelo tratamento com estatinas e também pela ezetimiba, como se observa neste estudo.

A interação de monócitos com células endoteliais pode promover a expressão e secreção de moléculas de adesão, como a e-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (Libby, 2010). Dessa forma, a ezetimiba em associação com sinvastatina pode inibir a progressão da aterosclerose através da inibição de sVCAM-1 e e-selectina.

A associação de sinvastatina e ezetimiba também reduziu a expressão de *MMP9*, em diabéticos, quando comparadas as fases S e SE. Em cultura de células musculares lisas (HUASMCs) incubadas por 24h, a expressão de *MMP9* foi reduzida pelas concentrações de 7 e 10 ng/mL de rosuvastatina, concentrações equivalentes a 20 e 40mg/dia, sendo a redução dose-dependente (Sapienza *et al.*, 2011). Em ratos hipercolesterolêmicos e diabéticos tratados com 50mg/kg de atorvastatina por 48 dias

foi observada a redução da expressão de *VCAM1*, *TNFA* e *IL1B* (Riad *et al.*, 2007). Não foram encontrados trabalhos com expressão desses genes em hipercolesterolêmicos e/ou diabéticos utilizando sinvastatina e ezetimiba.

Neste estudo, observou-se uma relação positiva entre a expressão de mRNA de *PAI1*, *ICAM1*, *RETN* e *ADIPOR1*, em CMSP de diabéticos, e a dose de sinvastatina, sugerindo uma modulação destes genes pela estatina de forma dose dependente. Por outro lado, a expressão de *IL6* foi menor após o tratamento com ezetimiba, também dependente da dose inicial de sinvastatina.

Como visto anteriormente, a hipercolesterolemia e hiperglicemia contribuem para expressão de moléculas de adesão e citocinas no endotélio vascular, responsáveis pelo recrutamento células mononucleares (Mestas *et al.*, 2008). Dessa forma, era de se esperar que, pela redução de LDL colesterol, os primeiros fatores a serem reduzidos seriam as moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, e-selectina, tanto sua expressão como suas concentrações plasmáticas. A redução das concentrações plasmáticas foi observada experimentalmente em diabéticos, mas sua expressão não foi reduzida pelo tratamento. Depois, as concentrações plasmáticas e expressão das MCP-1, citocina responsável pelo recrutamento de mononucleares, deveriam ser reduzidas após o tratamento hipolipemiante, o que não foi observado nem quanto as concentrações plasmáticas nem quanto expressão neste estudo.

Um dado interessante foi a menor expressão de *LEP* e *ADIPOR1* observada nos indivíduos DM2 com maior redução de LDL colesterol após a combinação da sinvastatina com ezetimiba. Esse resultado é sugestivo de que a expressão desses genes em CMSP é modulada pela colesterolemia pós-tratamento hipolipemiante.

O perfil inflamatório, representado pela adipocinas e moléculas de adesão: *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, mais expressas em indivíduos hipercolesterolêmicos diabéticos que em hipercolesterolêmicos não diabéticos, pode ser explicado por ter mais obesos no grupo DM2 que no grupo HC. Já o PAI-1 é comumente maior em indivíduos com diabetes tipo 2 e o VCAM-1 está fortemente relacionado com a leptina (Pires *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÕES

A hipercolesterolemia modula a expressão de mRNA de *IL6* e *IL1B*, em células mononucleares.

A monoterapia de ezetimiba influencia a expressão de mRNA de *IL6*, em células mononucleares de hipercolesterolêmicos, de forma dependente da resposta de LDL colesterol.

A dose de sinvastatina modula a expressão de *PAI1*, *ICAM1*, *RETN* e *ADIPOR1*, em células mononucleares de hipercolesterolêmicos diabéticos.

A ezetimiba em associação com sinvastatina reduz a expressão de mRNA de *MMP9*, em células mononucleares de hipercolesterolêmicos diabéticos.

A sinvastatina e a ezetimiba isoladas ou em combinação não modificam a expressão de mRNA de *TNFA*, *MCP1*, *VCAM1*, *LEP* e *ADIPOR2*, em células mononucleares de hipercolesterolêmicos com e sem diabetes.

A diabetes está relacionada com aumento de expressão de mRNA de *PAI1*, *VCAM1*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, em células mononucleares de hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina, independentemente da dose.

A sinvastatina e a ezetimiba em associação reduzem a adiponectinemia, em hipercolesterolêmicos independente da diabetes, e influenciam a concentração plasmática de PCRus, e-selectina, sICAM-1 e sVCAM-1, em diabéticos.

As concentrações plasmáticas de IL1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-9, MCP-1, PAI-1, leptina e resistina não são influenciadas por sinvastatina e/ou ezetimiba, em hipercolesterolêmicos com e sem diabetes.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Arca M, Pigna G, Favoccia C. Mechanisms of Diabetic Dyslipidemia: Relevance for Atherogenesis. *Current Vascular Pharmacology*. 2012; 10:684-686.
2. Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K, Antoniades C. Statins as Anti-Inflammatory Agents in Atherogenesis: Molecular Mechanisms and Lessons from the Recent Clinical Trials. *Current Pharmaceutical Design*. 2012; 18:1519-1530.
3. Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway *J Clin Immunol*. 2011;31:472–478.
4. American Diabetes Association – ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013; 36(1):67-75.
5. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory Process in Type 2 Diabetes The Role of Cytokines. *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1084: 89–117.
6. Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF-B1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010; 64:29- 34.
7. Athyros VG, Mikhailidis DP. Patient with hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and chronic kidney disease treated with atorvastatin and omega-3 Fatty Acid ethyl esters. *Open Cardiovasc Med J*. 2012; 6:122-5.
8. Bays EG, Neff D, Tomassini JE, Tershakovec AM. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev. Cardiov. Ther*. 2008. 6(4): 447-470.
9. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Mechanisms of endocrine disease - Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(2):463–478.

10. Barlovic DP, Thomas MC, Jandeleit-Dahm J. Cardiovascular Disease: What's All the AGE/RAGE About? Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets. 2010; 10: 7-15.
11. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KAM. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. Clinical Science. 2011; 121, 43–55.
12. Bell DSH, Al Badarin F, O'Keefe JK. Therapies for diabetic dyslipidaemia. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2011; 13: 313–325.
13. Berthold HK, Berneis K, Mantzoros CS, Krone W, Gouni-Berthold I. Effects of simvastatin and ezetimibe on interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein. Scandinavian Cardiovascular Journal, 2012; Early Online: 1–8.
14. Bláha V, Andrýs C, Smahelová A, Knízek J, Hyspler R, Solichová D, Bláha M, Zadák Z. Effect of atorvastatin on soluble CD14, CD40 Ligand, sE- and sP-selectins and MCP-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to cholesterol turnover. Pharmacol Res. 2006; 54(6):421-8.
15. Bolewski A, Lipiecki J, Plewa R, Burchardt P, Siminiak T. The effect of atorvastatin treatment on lipid profile and adhesion molecule levels in hypercholesterolemic patients: relation to low-density lipoprotein receptor gene polymorphism. Cardiology. 2008; 111(2):140-6.
16. Bozzetto L, Annuzzi G, Corte GD, Patti L, Cipriano P, Mangione A, Riccardi G, Rivellese AA. Ezetimibe beneficially influences fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes Atherosclerosis. 2011; 217(1):142-8.
17. Bray GA, Jablonski KA, Fujimoto WY, Barrett-Connor E, Haffner S, Hanson RL, Hill JO, Hubbard V, Kriska A, Stamm E, Pi-Sunyer FX, Diabetes Prevention Program Research Group. Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program. Am J Clin Nutr. 2008; 87(5): 1212–1218.
18. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic Acids and Endothelium-Dependent Responses. Pflugers Arch. 2010; 459(6): 881–895.

19. Catapano AL, Grigore L, Norata GD. Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. *Vascular Health and Risk Management*. 2008; 4(2) 267–278.
20. Colagiuri S. Diabetes: therapeutic options. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2010; 12:463–473.
21. Cuccurullo C, Iezzi A, Fazio ML, De Cesare D, Di Francesco A, Muraro R, Bei R, Uchino S, Spigonardo F, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A, Cipollone F. Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(12):2716–23.
22. Daugherty A, Rateri DL, Lu H, Inagami T, Cassis LA. Hypercholesterolemia Stimulates Angiotensin Peptide Synthesis and Contributes to Atherosclerosis Through the AT1A Receptor. *Circulation*. 2004; 110:3849–3857;
23. Davidson JE, Lockhart A, Amos L, Stirnadel-Farrant HA, Mooser V, Sollberger M, Regeniter A, Monsch AU, Irizarry MC. Plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and cognitively healthy elderly subjects: a cross-sectional study. *Alzheimers Res Ther*. 2012; 4(6):51.
24. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin N Am*. 2004; 88:787–835.
25. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1b as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol*. 2011; 41:1203–1217.
26. Eber B, Lautsch D, Fauer C, Drezel H, Pfeiffer KP, Traindl O, Pichler M. Can LDL-cholesterol targets be achieved in a population at high risk? Results of the non-interventional study ACTII. *Curr Med Res & Op*. 2012; 28(9):1447–54.
27. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, Gao P, Walker M, Thompson A, Sarwar N, Caslake M, Butterworth AS, Amouyel P, Assmann G, Bakker SJ, Barr

- EL, Barrett-Connor E, Benjamin EJ, Björkelund C, Brenner H, Brunner E, Clarke R, Cooper JA, Cremer P, Cushman M, Dagenais GR, D'Agostino RB Sr, Dankner R, Davey-Smith G, Deeg D, Dekker JM, Engström G, Folsom AR, Fowkes FG, Gallacher J, Gaziano JM, Giampaoli S, Gillum RF, Hofman A, Howard BV, Ingelsson E, Iso H, Jørgensen T, Kiechl S, Kitamura A, Kiyohara Y, Koenig W, Kromhout D, Kuller LH, Lawlor DA, Meade TW, Nissinen A, Nordestgaard BG, Onat A, Panagiotakos DB, Psaty BM, Rodriguez B, Rosengren A, Salomaa V, Kauhanen J, Salonen JT, Shaffer JA, Shea S, Ford I, Stehouwer CD, Strandberg TE, Tipping RW, Tosetto A, Wassertheil-Smoller S, Wennberg P, Westendorp RG, Whincup PH, Wilhelmsen L, Woodward M, Lowe GD, Wareham NJ, Khaw KT, Sattar N, Packard CJ, Gudnason V, Ridker PM, Pepys MB, Thompson SG, Danesh J. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. *N Engl J Med*. 2012; 367:1310-20.
28. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis Supplements*. 2004; 5(3):67–80.
29. Fazio S, Guyton JR, Lin J, Tomassini JE, Shah A, Tershakovec AM. Long-term efficacy and safety of ezetimibe/simvastatin coadministered with extended-release niacin in hyperlipidaemic patients with diabetes or metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2010; (11):983-93.
30. Fargnoli JL, Sun Q, Olenczuk D, Qi L, Y Zhu, Hu FB, Mantzoros CS. Resistin is associated with biomarkers of inflammation while total and HMW adiponectin are associated with biomarkers of inflammation, insulin resistance, and endothelial function. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162(2): 281–288.
31. Forst T, Pfützner A, Lqbbe G, Weber M, Marx N, Karagiannis E, Koehler C, Baurecht W, Hohberg C, Hanefeld M. Effect of simvastatin and/or pioglitazone on insulin resistance, insulin secretion, adiponectin, and proinsulin levels in nondiabetic patients at cardiovascular risk—the PIOSTAT Study. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2007; 56:491 – 496.

32. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; (18):499-502.
33. Friedman HS, Rajagopalan S, Barnes JP, Roseman H. Combination Therapy With Ezetimibe/Simvastatin Versus Statin Monotherapy for Low-Density Lipoprotein Cholesterol Reduction and Goal Attainment in a Real-World Clinical Setting. *Clinical Therapeutics.* 2011; 33(2):212-225.
34. Ganapathy-Kanniappan S, Kunjithapatham R, Geschwind JF. Statins impair glucose uptake in tumor cells. *Cancer Biol Ther.* 2012; 14(2). [Epub ahead of print]
35. Geistanger A, Arends S, Berding C, Hoshino T, Jeppsson JO, Little R, Siebelder C, Weykamp C. on behalf of the IFCC Working Group on Standardization of Hemoglobin A1c. Statistical Methods for Monitoring the Relationship between the IFCC Reference Measurement Procedure for Hemoglobin A1c and the Designated Comparison Methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clinical Chemistry.* 2008; 54(8): 1379–1385.
36. Gouni-Berthold I, Berthold HK, Chamberland JP, Krone W, Mantzoros CS. Short-term treatment with ezetimibe, simvastatin or their combination does not alter circulating adiponectin, resistin or leptin levels in healthy men. *Clinical Endocrinology.* 2008;68:536–541.
37. Jimenez JG, Rosen JB, Pirags V, Massaad R, Hanson ME, Brudi P, Triscari J. The efficacy and safety of ezetimibe/simvastatin combination compared with intensified lipid-lowering treatment strategies in diabetic subjects with and without metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2012. [Epub ahead of print]
38. Hansen D, Dendale P, Beelen M, Jonkers RAM, Mullens A, Corluy L, Meeusen R, van Loon LJC. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 109:397–404.

39. Hajer GR, Dallinga-Thie GM, van Vark-van der Zee LC, Olijhoek JK, Visseren FLJ. Lipid-lowering therapy does not affect the postprandial drop in high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) plasma levels in obese men with metabolic syndrome: a randomized double blind crossover trial. *Clinical Endocrinology*. 2008; 69:870–877.
40. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen H, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J*. 2003;374:1–20.
41. Heintjes EM, van Beest FJAP, Plat AW, Meeding WJ, Webb K, Sturkenboom MC, Herings RMC. Cholesterol Level Goal Attainment with Statins: Clinical Management Guideline Recommendations versus Management in Actual Clinical Practice. *Pharmacotherapy*. 2012; 32(7):631-41.
1. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Wilson PWF, Meigs JB. Associations of Adiponectin, Resistin, and Tumor Necrosis Factor- α with Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(8): 3165–3172.
2. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 5th Ed. Disponível em www.idf.org/diabetesatlas.
3. Izidoro-Toledo TC, Guimaraes DA, Belo VA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011; 383(6):547-54.
4. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity *J. Clin. Invest*. 2006;116:1494–1505.
5. Kai T, Arima S, Taniyama Y, Nakabou M, Kanamasa K. Comparison of the Effect of Lipophilic and Hydrophilic Statins on Serum Adiponectin Levels in Patients with Mild Hypertension and Dyslipidemia: Kinki Adiponectin

- Interventional (KAI) Study. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2008; 30:530–540.
6. Kennedy EH, Wiitala WL, Hayward RA, Sussman JB. Improved Cardiovascular Risk Prediction Using Nonparametric Regression and Electronic Health Record Data. *Medical Care*. 2012. Article in press.
 7. Kishimoto M, sugiyama T, Osame K, Takarabe D, Okamoto M, Noda M. Efficacy of ezetimibe as monotherapy or combination therapy in hypercholesterolemic patients with and without diabetes. *J of Medical Invest*. 2011; 58: 86-94.
 8. Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory Markers and the Metabolic Syndrome Insights From Therapeutic Interventions. *JACC*. 2005; 46(11):1978-85.
 9. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Ahn JY, Kim SJ, Koh Y, Shin EK. Simvastatin Improves Flow-Mediated Dilation but Reduces Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity in Hypercholesterolemic Patients. *Diabetes Care*. 2008; 31:776–782.
 10. Kokkinos P. Physical Activity, Health Benefits, and Mortality Risk. *ISRN Cardiol*. 2012; 2012: 718789.
 11. Kolovou GF, Vasiliadis I, Anagnostopoulou K, Cokkinos DV. Simvastatin: Two Decades in a Circle. *Cardiovascular Therapeutics*. 2008; 26:166–178.
 12. Krauss RM, Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:1496–1504
 13. Krysiak R, Zmud W, Okopien B. The effect of ezetimibe, administered alone or in combination with simvastatin, on lymphocyte cytokine release in patients with elevated cholesterol levels. *J InternMed* 2011; 2011. A
 14. Krysiak R, Okopien B. The Effect of Ezetimibe and Simvastatin on Monocyte Cytokine Release in Patients With Isolated Hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57:505–512. B

15. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jona'k J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27:95–125.
16. Lagani V, Koumakis L, Chiarugi F, Lakasing E, Tsamardinos I. A Systematic review of predictive risk models for diabetes complications based on large scale clinical studies. *J of Diabetes and Its Complications*. 2012. Article in press.
17. Li J, Jiang J, Yin H, Wang L, Tian R, Li H, Wang Z, Li D, Wang Y, Gui Y, Walsh MP, Zheng XL. Atorvastatin inhibits myocardin expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2012; 60(1):145-53.
18. Libby P, Plutzky J. Diabetic Macrovascular Disease: The Glucose Paradox? *Circ J*, 2002; 106: 2760-2763.
19. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in Atherosclerosis: Transition From Theory to Practice. *Circ J*, 2010; 74: 213 – 220.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001; 25(4): 402-408.
21. Löfgren P, van Harmelen V, Reynisdottir S, Näslund E, Rydén M, Rössner S, Arner P. Secretion of Tumor Necrosis Factor- α Shows a Strong Relationship to Insulin-Stimulated Glucose Transport in Human Adipose Tissue. *Diabetes*. 2000; 49:688-92.
22. Luo R, Li X, Jiang R, Gao X, Lüand Z, Hua W. Serum Concentrations of Resistin and Adiponectin and Their Relationship to Insulin Resistance in Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *The Journal of International Medical Research*. 2012; 40: 621 – 630.
23. Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(8):993-7.

24. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, Carluccio MA, Storelli C, Distante A, De Caterina R. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovascular Research*. 2010; 86: 311–320.
25. Matafome P, Monteiro P, Nunes E, Louro T, Amaral C, Moedas AR, Gonçalves L, Providência L, Seic R. Therapeutic association of atorvastatin and insulin in cardiac ischemia: Study in a model of type 2 diabetes with hyperlipidemia. *Pharmacological Research*. 2008; 58 (3–4): 208–214.
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28(7):412-9.
27. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos FJ, Golay A, Dayer JM. IL-1 Receptor Antagonist Serum Levels Are Increased in Human Obesity: A Possible Link to the Resistance to Leptin? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(3):1184–1188.
28. Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa, Uusitupa M. Effect of wight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2008; 57:192-199.
29. Mestas J, Ley K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; 18(6): 228–232.
30. Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S. Lipoprotein Modification and Macrophage Uptake: Role of Pathologic Cholesterol Transport in Atherogenesis. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Subcellular Biochemistry*. 2010; 51:229-251.
31. Moutzouri E, Liberopoulos E, Mikhailidis DP, Kostapanos MS, Kei AA, Millionis H, Elisaf M. Comparison of the effects of simvastatin vs.

- rosuvastatin vs. simvastatin/ezetimibe on parameters of insulin resistance. *Int J Clin Pract*, November 2011, 65, 11, 1141–1148.
32. Muniyappa R, Yavuz S. Metabolic actions of angiotensin II and insulin: A microvascular endothelial balancing act. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; Article in press.
 33. Nazer B, Ray KK, Murphy SA, Gibson CM, Cannon CP. Urinary albumin concentration and long-term cardiovascular risk in acute coronary syndrome patients: a PROVE IT-TIMI 22 substudy. *J Thromb Thrombolysis*. 2012
 34. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011; 378: 169–81.
 35. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Inami N, Tanaka A, Nanba M, Shouda Y, Takahashi N, Kimura Y, Iwasaka T. Correlation between adiponectin and reduction of cell adhesion molecules after pitavastatin treatment in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res*. 2008; 122(1):39-45.
 36. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life sciences*. 200; 78:291-300.
 37. Pires IF, Chaves PC, Silva DM, Lourenço AP, Moreira AFL. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discovery Today*. 2012; 12(15-16):880-9.
 38. Ploplis VA. Effects of Altered Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression on Cardiovascular Disease. *Current Drug Targets*. 2011; 12:1782-1789.
 39. Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 297:E568–E577.

40. Pounis G, Costanzo S, di Giuseppe R, de Lucia F, Santimone I, Sciarretta A, Barisciano P, Persichillo M, de Curtis A, Zito F, Di Castelnuovo AF, Sieri S, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L on behalf of the Moli-sani Project Investigators. Consumption of healthy foods at different content of antioxidant vitamins and phytochemicals and metabolic risk factors for cardiovascular disease in men and women of the Moli-sani study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012; 1–7.
41. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*. 2007; 380(1-2): 24–30.
42. Ray A, Huisman MV, Tamsma JT, Research and Writing-group van Asten J, Bingen BO, Broeders EABJ, Hoogeveen ES, van Hout F, Kwee VA, Laman B, Malgo F, Mohammadi M, Nijenhuis M, Rijkée M, van Tellingen MM, Tromp M, Tummers Q, de Vries L. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus *European Journal of Internal Medicine*. 2009; 253–260.
43. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2009; 23:145–151.
44. Riad A, Du J, Stiehl S, Westermann D, Mohr Z, Sobirey M, Doehner W, Adams V, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 569:204–211.
45. Robinson JG. What Is the Role of Advanced Lipoprotein Analysis in Practice? *J of the American College of Cardiology*. 2012; 60(25): 2607-15.
46. Romero CX, Romero TE, Shlay JC, Ogden LG, Dabelea D. Changing Trends in the Prevalence and Disparities of Obesity and Other Cardiovascular Disease Risk Factors in Three Racial/Ethnic Groups of USA Adults. *Advances in Preventive Medicine*. 2012; 2012: 8.

47. Rotella CM, Zaninelli A, Le Grazie C, Hanson ME, Gensini GF. Ezetimibe/simvastatin VS simvastatin in coronary heart disease patients with or without diabetes. *Lipids in Health and Disease*. 2010; 9:80.
48. Sapienza P, Borrelli V, Sterpetti AV, Dinicola S, Tartaglia E, di Marzo L. Dose-Dependent Effect of Rosuvastatin in the Regulation of Metalloproteinase Expression. *Ann Vasc Surg*. 2011; 25: 823-829.
49. Sarigianni M, Katsiki N, Mikhailidis DP. Ezetimibe in diabetes: more than cholesterol lowering? *Current Medical Research & Opinion*. 2010; 26(10): 2517–2520.
50. Schaw JE, Sicree RA, Zimmet RS. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010; 87:4–14. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 Trans-Signalling in Chronic Inflammation and Cancer. *Scandinavian J of Immunology*. 2006; 63:321-9.
51. Sevin G, Akcay YD, Ozsarlak-Sozer G, Yasa M. Low-dose fluvastatin prevents the functional alterations of endothelium induced by short-term cholesterol feeding in rabbit carotid artery. *Scientific World Journal*. 2012; 2012:671728.
52. Simon Schenk, Maziyar Saberi, and Jerrold M. Olefsky. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest*. 2008; 118:2992–3002.
53. Schönbeck U, Libby P. inflammation, Immunity, and HMG-CoA Reductase Inhibitors - Statins as Antiinflammatory Agents? *Circulation*. 2004; 109:II-18-II-26
54. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2010; 9: 830–834.

55. Slany J. Zielwerterreichung unter lipidsenkender Therapie mit Ezetimib/Simvastatin bei Patienten mit Atherosklerose und/oder Diabetes mellitus – eine österreichische Anwendungsbeobachtung Wien Med Wochenschr. 2009; 159(21–22):558–564.
1. Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007; 88 (1): 1-18.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em www.diabetes.org.br/publicacoes.
3. Song JX, Ren JY, Chen H. Simvastatin Reduces Lipoprotein-associated Phospholipase A2 in Lipopolysaccharide-stimulated Human Monocyte-derived Macrophages Through Inhibition of the Mevalonate–Geranylgeranyl Pyrophosphate–RhoA-p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. J Cardiovasc Pharmacol. 2011; 57(2): 213-222.
4. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AFH. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes - Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. Diabetes. 2003;52:812-7
5. Tesouro M, Canale MP, Rodia G, Di Daniele N, Lauro D, Scuteri A, Cardillo C. Metabolic Syndrome, Chronic Kidney, and Cardiovascular Diseases: Role of Adipokines. Cardiology Research and Practice. 2011; 2011.
6. Tobaru T, Seki A, Asano R, Sumiyoshi T, Hagiwara N. Lipid-lowering and anti-inflammatory effect of ezetimibe in hyperlipidemic patients with coronary artery disease. Heart Vessels; 2010.
7. Toman O, Novotny T, Sisakova M, Hnatkova K, Andrsova I, Parenica J, Poloczek M, Jenysova R, Manouskova L, Spinar J, Malik M. Effect of atorvastatin on dynamic parameters of myocardial repolarization in healthy subjects. J Electrocardiol. 2012; 45(6):752-7.

8. Tomassini JE, Mazzone T, Goldberg RB, Guyton JR, Weinstock RS, Polis A, Jensen E, Tershakovec AM. Effect of ezetimibe/simvastatin compared with atorvastatin on lipoprotein subclasses in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolaemia. *Diabetes Obes Metab.* 2009; 11(9):855-64.
9. Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Curr Opin Cardiol.* 200; 318:471–478.
10. de Vries FM, Denig P, Pouwels KB, Postma MJ, Hak E. Primary prevention of major cardiovascular and cerebrovascular events with statins in diabetic patients: a meta-analysis. *Drugs.* 2012; 72(18):2365-73.
11. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *Journal of Vascular Surgery.* 2011; 54(3):819-31.
12. Wæhre T, Yndestad A, Smith C; Haug T, Tunheim SH, Gullestad L, Frøland SS, Semb AG, Aukrust P, Damås JK. Increased Expression of Interleukin-1 in Coronary Artery Disease With Downregulatory Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Circulation.* 2004; 109:1966-1972.
13. Wagenknecht LE, Langefeld CD, Scherzinger AL, Norris JM, Haffner SM, Saad MF, Bergman RN. Insulin Sensitivity, Insulin Secretion, and Abdominal Fat - The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes.* 2003;52:2490-6.
14. Wang Y, Chang H, Zou J, Jin X, Qi Z. The effect of atorvastatin on mRNA levels of inflammatory genes expression in human peripheral blood lymphocytes by DNA microarray. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2011; 65:118–122.
15. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1785–1788.
16. Yamagishi S. Advanced Glycation End Products and Receptor–Oxidative Stress System in Diabetic Vascular Complications. *Therapeutic Apheresis and Dialysis.* 2009; 13(6):534–539.

17. Yaseen F, Jaleel A, Aftab J, Zuberi A, Alam E. Circulating levels of resistin, IL-6 and lipid profile in elderly patients with ischemic heart disease with and without diabetes. *Biomarkers in Medicine*. 2012; 6(1):97-102.
18. Yi W, Sun Y, Gao E, Wei X, Lau WB, Zheng Q, Wang Y, Yuan Y, Wang X, Tao L, Li R, Koch W, Ma XL. Reduced Cardioprotective Action of Adiponectin in High-Fat Diet–Induced Type II Diabetic Mice and Its Underlying Mechanisms Antioxid. Redox Signal. 2011;15, 1779–1788.
19. Zeng M, Zhang M, Lowell C, He P. Tumor necrosis factor- α -induced leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283:H2420–H2430.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo 2 – CEP – “Estudos de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes

Anexo 1

Hospital Universitário e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Pesquisa: Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

“Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes”

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário: _____
Documento de identidade Nº: _____ Sexo: M ☐ F ☐
Data de nascimento: ____/____/_____
Endereço: _____ no. ____ apto: ____
Bairro: _____ Cidade: _____
CEP: _____ Telefone: _____

Prezado Paciente,

Meu nome é Rosario D.C. Hirata, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos da Divisão de Clínica Médica que estão fazendo seu atendimento no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Nesta pesquisa, vou medir gorduras (lipídeos) e açúcar no sangue, e fazer testes genéticos (DNA) e testes de laboratório especiais (RNA e proteínas) para verificar se existe relação entre alterações no DNA, RNA e proteínas com a resposta a medicamentos que diminuem o colesterol.

Se aceitar participar desta pesquisa, será coletada uma amostra de sangue (10 mL) em jejum para os exames laboratoriais de lipídeos (triglicerídeos e colesterol e suas frações), apolipoproteínas AI e B (proteínas relacionadas com os lipídeos), glicose, hemoglobina glicada e insulina (para avaliar a diabetes) e enzimas (para avaliar alterações do fígado e do músculo). Também serão coletadas duas amostras de sangue (10 mL cada), uma para avaliar o DNA e outra para medir o RNA e as proteínas nas células do sangue. No DNA, serão estudados polimorfismos (alterações no DNA) de vários genes (informações do DNA) que estão relacionados com o metabolismo do colesterol. A sua amostra de DNA será guardada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico (LBMAD) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e poderá ser utilizada para pesquisas futuras relacionadas com colesterol alto e diabetes. Se isso ocorrer, você será consultado a respeito.

Se o seu colesterol estiver normal você vai participar da pesquisa uma única vez. Se você tiver diabetes e o seu colesterol estiver alto (LDL colesterol maior que 100 mg/dL) o seu médico irá receitar a sinvastatina por dois meses. Se o seu colesterol continuar alto, o médico vai receitar o ezetimibe junto com a sinvastatina por mais um mês. Portanto, você vai participar do estudo durante três meses e as coletas de sangue vão ser feitas após dois meses de tratamento com sinvastatina e depois de um mês de tratamento com os dois medicamentos juntos. Em cada visita ao hospital, serão coletadas duas amostras de sangue em jejum, uma (10 mL) para os exames laboratoriais e a outra (10 mL) para medir RNA e proteínas nas células.

Se você não tem diabetes e o colesterol estiver alto (colesterol total maior que 200 mg/dL e LDL colesterol maior que 160 mg/dL) e, caso esteja tomando medicamento para diminuir o colesterol e o seu médico achar apropriado e seguro, você terá de parar o tratamento durante um mês, enquanto isso, você terá que fazer uma dieta especial (pouco colesterol e gordura saturada). Essa dieta será orientada pelo Setor de Nutrição do HU/USP. Depois

1

(Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo pesquisador).

disso, se for necessário, você terá que tomar medicamentos para diminuir o colesterol. O seu médico vai receitar primeiro o ezetimibe por um mês e, depois, a sinvastatina por dois meses. Se o seu colesterol continuar alto, o médico vai receitar o ezetimibe junto com a sinvastatina por mais um mês. Portanto, você vai participar do estudo durante cinco meses e as coletas de sangue vão ser feitas antes da dieta, após um mês de dieta, após um mês de tratamento com ezetimibe, após dois meses de tratamento com sinvastatina e depois de um mês de tratamento com os dois medicamentos juntos. Em cada visita ao hospital, serão coletadas duas amostras de sangue em jejum, uma (10 mL) para os exames laboratoriais e a outra (10 mL) para medir RNA e proteínas nas células.

Além de você, outros trezentos e noventa e nove pacientes também participarão da pesquisa. Precisaréi, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nos seus familiares e o tipo de alimentação e os medicamentos que está tomando.

O risco a sua saúde será mínimo e não depende da coleta de sangue que poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Pode ser também por aparecimento de efeitos colaterais dos medicamentos sinvastatina e ezetimibe (dor de cabeça, cansaço, dor de barriga, diarreia, prisão de ventre, gases, enjôo, dor muscular e outros). Esses medicamentos são considerados seguros para o tratamento de colesterol alto, mas algumas pessoas têm efeitos colaterais. Se você tiver algum desses efeitos comunique imediatamente ao seu médico e, nesse caso, a sua participação no estudo poderá ser interrompida.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Você e seu médico terão acesso aos resultados dos exames de laboratório necessários, sem qualquer custo. Caso você se interesse, também terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa que vai durar três anos. Suas informações serão mantidas em sigilo e somente serão disponibilizadas com seu consentimento.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no HU/USP não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do LBMAD da FCF/USP, onde serão guardados.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido ao fato de você não ter cumprido as orientações dadas ou pelo cancelamento da pesquisa por falta de recurso financeiro, por falta de voluntários para a pesquisa ou por outro tipo de problema. A pesquisa também será encerrada se houver algum risco adicional para você que não foi previsto.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato comigo ou com as pesquisadoras Simone S. Arazi, Fabiana D. V. Genvigir e Alvaro Cerda, nos telefones 3091-3660 e 3091-3634. Também poderá contatar o Dr. Egidio L. Dorea da Divisão de Clínica Médica do HU/USP (tel.: 3039-9433 e 3039-9275), ou o Comitê de Ética do HU/USP (Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, CEP: 05508-900, São Paulo, SP - Telefones: 3039-9457 ou 3039-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br) a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Anexo 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 54/2007

São Paulo, 08 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Rosário Domingos Crespo Hirata
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 07 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes" (Protocolo CEP nº 426) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP