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

**Receptor *scavenger* BI: efeito de polimorfismos e atorvastatina na
expressão gênica em indivíduos hipercolesterolêmicos**

Álvaro Danilo Cerda Maureira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2009

Álvaro Danilo Cerda Maureira

Receptor *scavenger* BI: efeito de polimorfismos e atorvastatina na
expressão gênica em indivíduos hipercolesterolêmicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

...À Mónica, meus pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

À professora Rosário D.C. Hirata, minha orientadora, pelo apoio, dedicação e generosidade constantes. Minha mais sincera gratidão.

Ao professor Mario Hirata ajuda e conselhos desinteressados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Luis Salazar pelo importante apoio e orientação no início da minha formação científica.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Tit Ana Campa.

Ao Programa de Estudante Convenio de pós-graduação (PEC-PG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida a partir de março de 2008.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em nome do Dr. Egídio Lima Dorea e a Dra. Marcia M.S. Bernik, pela colaboração na seleção e acompanhamento dos pacientes participantes deste trabalho.

À Seção Médica de Lipoproteínas do Instituto Dante Pasanezze de Cardiologia, em nome do Dr. André Arpad Faludi e o Dr. Marcelo Chiara Bertolami, pela colaboração na seleção de pacientes.

Ao Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Tit. Marina Baquerizo Martinez, pela coleta de amostras e análises bioquímicas utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Ambulatórios e da Unidade Básica de Atendimento à Saúde (UBAS) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Aos pacientes das diferentes instituições envolvidas neste estudo, que contribuíram de maneira anônima e desinteressada para a execução deste trabalho.

À Cristina Moreno Fajardo, Técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia molecular Aplicada ao Diagnóstico, pelo apoio e amizade.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Luis Salazar, Dr. André Arpad Faludi e Dra. Rosário Hirata, pela importante contribuição na realização desta dissertação.

Ao professor Carlos Pires, pela revisão do texto e úteis comentários na elaboração deste trabalho.

CERDA, A. **Receptor scavenger BI: efeito de polimorfismos e atorvastatina na expressão gênica em indivíduos hipercolesterolêmicos**. 2009. 130f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RESUMO

O receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI) media a captação seletiva do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) e participa no efluxo do colesterol livre para aceptores lipoprotéicos. A HDL tem um importante rol aterogênico associado com sua participação no transporte reverso do colesterol. Polimorfismos no gene que codifica para o SR-BI (*SCARB1*) foram relacionados com alterações do perfil lipídico sérico e outros fatores de risco associados com doença cardiovascular. As estatinas são inibidores da síntese do colesterol utilizados no tratamento da dislipidemia. Vários polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo intermediário de lipídeos foram relacionados com diferenças na resposta a hipolipemiantes. Com a finalidade de avaliar o efeito de polimorfismos do *SCARB1* sobre o perfil lipídico sérico, expressão gênica e a resposta a estatinas, foram selecionados 185 indivíduos normolipidêmicos (NL) e 147 pacientes hipercolesterolêmicos (HC). Os pacientes HC foram tratados com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas). DNA e RNA foram extraídos de amostras de sangue periférico. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) G4A, In5C>T e Ex8C>T foram detectados por PCR-RFLP. A expressão de RNAm do *SCARB1* em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foi analisada por PCR em tempo real usando o gene da Ubiquitina c (*UBC*) como referência endógena. Nos indivíduos HC, as frequências dos alelos raros G4A (12%), In5C>T (7%) e Ex8C>T (40%), no grupo HC, foram similares às encontradas no grupo NL (4A: 15%, In5T: 7%, e Ex8T: 35%, $p>0,05$). O alelo *SCARB1* 4A (genótipos GA + AA) foi associado com valores diminuídos de apoA1 no grupo NL. O alelo In5T foi associado com maior concentração LDL-C sérico ($p=0,029$), em NL, e com apoB e razão apoB/apoA1 elevadas ($p>0,05$) no grupo HC. O SNP *SCARB1* Ex8C>T não foi relacionado com o perfil lipídico sérico basal, embora os portadores do genótipo Ex8CC foram associados com resposta reduzida ao tratamento com atorvastatina mostrando menor variação de colesterol total, LDL-C, apoB e razão apoB/apoA1. O SNP Ex8C>T foi associado com maior probabilidade (OR=3,1; 95% IC: 1,00-9,5; $p=0,044$) de ter uma resposta à atorvastatina diminuída. Os SNPs *SCARB1* In5C>T e Ex8C>T estão em desequilíbrio de ligação. O haplótipo G₁C₅C₈/G₁T₅C₈ foi associado com concentrações basais elevadas de triglicérides e VLDL-C em NL e diminuídas de HDL-C e apoA1 em HC. Os haplótipos G₁C₅C₈/A₁C₅C₈ e C₅C₈/C₅C₈ tiveram variação diminuída da apoB quando comparados com os outros haplótipos, G₁C₅C₈/A₁C₅C₈ e o diplótipo C₅C₈/C₅C₈ também apresentou uma variação reduzida da razão apoB/apoA1. Os SNPs G4A e In5C>T estão associados com diminuição da expressão gênica do *SCARB1* em NL. O tratamento com atorvastatina não modifica a expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP nos HC. Esses resultados são sugestivos de que os polimorfismos no *SCARB1* estão associados com valores basais do perfil lipídico sérico e de expressão de RNAm do *SCARB1*, assim como de resposta à atorvastatina.

Palavras chave: Receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI). Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Farmacogenômica. Lipídeos. Atorvastatina

CERDA, A. **Scavenger receptor class BI: polymorphisms and atorvastatin effects on gene expression in hypercholesterolemic individuals**. 2009. 130p. Dissertation (Masters degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ABSTRACT

The scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates the selective uptake of the high density lipoprotein (HDL) cholesterol and it participates in the free cholesterol efflux to lipoprotein acceptors. HDL has an important antiatherogenic role associated with important activity in the cholesterol reverse transport. Polymorphisms in the SR-BI gene (*SCARB1*) have been related to variations on plasma lipoprotein profile and other risk factors for cardiovascular disease. Statins are potent inhibitors of cholesterol synthesis prescribed for treatment of the dyslipidemia. Several polymorphisms in genes involved in intermediary metabolism of lipids have been related to differences in response to lowering-cholesterol drugs. In order to evaluate the effect of *SCARB1* polymorphisms on serum lipids, gene expression and lipid-lowering response to atorvastatin, 185 normolipidemic (NL) and 147 hypercholesterolemic (HC) individuals were selected. HC individuals were treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks). DNA and RNA were extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *SCARB1* mRNA expression was analyzed by real time PCR using ubiquitin c gene (*UBC*) as endogenous reference. The frequencies of the rare alleles in HC group (G4A: 12%; In5C>T: 7%, and ExC>T: 39%) were similar to those found in NL individuals (4A: 15%, In5T: 7%, and Ex8T: 35%, $p>0.05$). The *SCARB1* 4A allele (GA+AA genotypes) was associated with lower apoA1 concentration in NL. The In5T allele was associated with higher serum LDL-C ($p=0.029$) in NL individuals, and with higher apoB and apoB/apoA1 ratio ($p>0.05$) in HC group. *SCARB1* Ex8C>T SNP was not related to serum lipids profile, however Ex8CC genotype carriers had lower variation of total cholesterol, LDL-C, apoB and apoB/apoA1 ratio in response to atorvastatin. *SCARB1* Ex8C>T was associated with higher chance to have a lower atorvastatin response (OR=3.1, 95% CI: 1.00-9.5; $p=0.044$). *SCARB1* In5C>T and ExC>T were in linkage disequilibrium. G₁C₅C₈/G₁T₅C₈ *SCARB1* haplotype was associated with higher level of triglycerides and VLDL-C in NL and lower HDL-C and apoA1 levels in HC individuals. G₁C₅C₈/A₁C₅C₈ haplotype and C₅C₈/C₅C₈ diplotype had lower variations on apoB than the other haplotypes, and G₁C₅C₈/A₁C₅C₈ had also lower variation on apoB/apoA1 ratio. G4A and In5C>T SNPs are associated with lower *SCARB1* mRNA expression in PBMC of NL individuals. Atorvastatin therapy did not modify the expression level of the *SCARB1* transcript in HC. Our results suggest that *SCARB1* polymorphisms are associated with basal serum lipids profile, mRNA *SCARB1* expression and atorvastatin response.

Keywords: Scavenger receptor class b type I (SR-BI). Single nucleotide polymorphism (SNP). Pharmacogenomics. Lipids. Atorvastatin.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AcLDL	LDL acetilada
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette A1</i>
Ala	Alanina
ALT	Alanina aminotransferase
ApoA1	apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
Bp	Pares de bases
C	Citosina
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína transportadora de esteres de colesterol
cDNA	DNA complementar
CLA-1	CD36 e proteína integral de membrana lisosomal II, análogo 1
CML	Células musculares lisas
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CK	Creatino quinase
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DM2	Diabetes melito tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
G	Guanina
Gly	Glicina
HC	Hipercolesterolêmicos
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da HDL
HMG-CoA	3-hidróxi-3metilglutaril Coenzima A
HMGCR	β -Hidroxi- β -metil-glutaril Coenzima A redutase
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IMC	Índice de massa corpórea
KCl	Cloreto de potasio
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL-C	Colesterol da LDL

LDLR	Receptor de LDL
LRP	Proteína relacionada ao RLDL
<i>MGB</i>	<i>Minor groove binder</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
NFQ	<i>Non-fluorescent quencher</i>
NL	Normolipidêmicos
OR	<i>Odds Ratio</i>
OxLDL	LDL oxidada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SR	Receptor scavenger
SR-A	Receptor scavenger classe A
SR-BI	Receptor scavenger classe B tipo I
<i>SCARB1</i>	Gene do Receptor scavenger classe B tipo I
T	Timina
T4L	Tetraiodotironina livre
TG	Triglicerídeos
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UBC	Ubiquitina c
UNG	Uracil N-glicosilase
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	Colesterol da VLDL

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho amostral estimado para o estudo de acordo com as frequências alélicas dos polimorfismos do <i>SCARB1</i>	34
Tabela 2. Iniciadores e tamanhos de produtos de PCR para análise dos polimorfismos do <i>SCARB1</i>	38
Tabela 3. Condições de PCR para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T.....	39
Tabela 4. Condições dos ensaios de RFLP para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T.....	41
Tabela 5. Características de sondas e iniciadores para ensaios de PCR em tempo real para os genes <i>UBQ</i> e <i>SCARB1</i>	48
Tabela 6. Características antropométricas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.....	53
Tabela 7. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo <i>SCARB1</i> G4A, em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos	55
Tabela 8. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo <i>SCARB1</i> In5C>T, em indivíduos hipercolesterolêmicos e Normolipidêmicos.....	55
Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo <i>SCARB1</i> Ex8C>T, em indivíduos hipercolesterolêmicos e Normolipidêmicos	56
Tabela 10. Frequências alélicas de polimorfismos <i>SCARB1</i> em diferentes populações.....	56
Tabela 11. Relação do SNP <i>SCARB1</i> G4A com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.....	58
Tabela 12. Relação do SNP <i>SCARB1</i> G4A com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.....	59
Tabela 13. Relação do SNP <i>SCARB1</i> In5C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.....	62
Tabela 14. Relação do SNP <i>SCARB1</i> In5C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.....	63
Tabela 15. Relação do SNP <i>SCARB1</i> Ex8C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.....	66
Tabela 16. Relação do SNP <i>SCARB1</i> Ex8C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.....	67
Tabela 17. Relação entre os polimorfismos <i>SCARB1</i> e a resposta de LDL colesterol ao tratamento com atorvastatina, em hipercolesterolêmicos....	70
Tabela 18. Distribuição de genótipos do SNP <i>SCARB1</i> Ex8C>T nos grupos resposta R≤34 e R>44.....	71
Tabela 19. Frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos <i>SCARB1</i> G4A, In5C>T e Ex8C>T em normolipidêmicos.....	72

Tabela 20. Frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos <i>SCARB1</i> G4A, In5C>T e Ex8C>T em hipercolesterolêmicos.....	73
Tabela 21. Distribuição de haplótipos <i>SCARB1</i> G4A, In5C>T e Ex8C>T em hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.....	74
Tabela 22. Frequências haplotípicas para os polimorfismos <i>SCARB1</i> em normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.....	75
Tabela 23. Relação dos haplótipos <i>SCARB1</i> , gerados pelos SNPs G4A, In5C>T e Ex8C>T, com os valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos normolipidêmicos.....	77
Tabela 24. Relação dos haplótipos <i>SCARB1</i> com os valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia).....	78
Tabela 25. Distribuição de haplótipos segundo os genótipos dos polimorfismos In5C>T e Ex8C>T no gene <i>SCARB1</i> em indivíduos Hipercolesterolêmicos e Normolipidêmicos.....	83
Tabela 26. Relação de diplotipos In5C>T e Ex8C>T <i>SCARB1</i> com valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos normolipidêmicos.....	84
Tabela 27. Relação dos diplotipos In5C>T e Ex8C>T <i>SCARB1</i> com valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.....	85
Tabela 28. Perfil lipídico sérico e frequências dos SNPs G4A, In5C>T e ExC>T de acordo com a expressão de RNAm do <i>SCARB1</i> em normolipidêmicos.....	93
Tabela 29. Perfil lipídico sérico e frequências dos SNPs G4A, In5C>T e ExC>T de acordo com a expressão basal de RNAm do <i>SCARB1</i> em hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papel do SR-BI no transporte reverso do colesterol.....	23
Figura 2. Representação esquemática do SCARB1.....	25
Figura 3. Produtos de restrição do SNP SCARB1 G4A com a enzima de restrição <i>AluI</i>	42
Figura 4. Produtos de restrição do SNP SCARB1 In5C>T com a enzima de restrição <i>Apal</i>	43
Figura 5. Produtos de restrição do SNP SCARB1 Ex8C>T com a enzima de restrição <i>HaeIII</i>	43
Figura 6. Relação do SNP SCARB1 G4A com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos.....	60
Figura 7. Relação do SNP SCARB1 G4A com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina.....	60
Figura 8. Relação do SNP SCARB1 In5C>T com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos.....	64
Figura 9. Relação do SNP SCARB1 In5C>T com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina.....	64
Figura 10. Relação do SNP SCARB1 Ex8C>T com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos.....	68
Figura 11. Relação do SNP SCARB1 Ex8C>T com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina.....	68
Figura 12. Relação do SNP SCARB1 Ex8C>T com percentagem de variação nos valores de lípides em indivíduos hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina.....	69
Figura 13. Perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos de acordo com os haplotipos do SCARB1.....	80
Figura 14. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos hipercolesterolêmicos de acordo com os haplótipos do SCARB1.....	80
Figura 15. Concentrações de apoB de indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia) de acordo com os haplótipos do SCARB1.....	81
Figura 16. Razão apoB/apoAI em indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia) de acordo com os haplótipos do SCARB1.....	81
Figura 17. Razão apoB/apoAI em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina, de acordo com os diplótipos Ex8C>T do SCARB1.....	86
Figura 18. Curva de eficiência de amplificação do <i>UBC</i> (A) e do <i>SCARB1</i> (B) e curva de validação do método do Ct comparativo (C).....	87
Figura 19. Expressão de mRNA SCARB1 em indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.....	88
Figura 20. Relação do SNP SCARB1 G4A com expressão de RNAm	

<i>SCARB1</i> em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.....	89
Figura 21. Relação do SNP <i>SCARB1</i> In5C>T com expressão de RNAm do <i>SCARB1</i> em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.	90
Figura 22. Relação do SNP <i>SCARB1</i> Ex8C>T com expressão de RNAm do <i>SCARB1</i> em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.	90
Figura 23. Relação dos haplótipos <i>SCARB1</i> com expressão de RNAm do <i>SCARB1</i> em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.....	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Casuística.....	32
3.2. Cálculo do tamanho amostral.....	33
3.3. Protocolo de tratamento.....	34
3.4. Aspectos éticos.....	34
3.5. Amostras biológicas.....	35
3.6. Determinações bioquímicas.....	35
3.7. Extração e avaliação de DNA.....	36
3.8. Análise dos polimorfismos do <i>SCARB1</i> por PCR-RFLP.....	38
3.9. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	44
3.10. Extração e avaliação de RNA total.....	44
3.11. Quantificação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....	45
3.12. Análise estatística dos resultados.....	48
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Dados demográficos dos grupos estudados.....	51
4.2. Frequências genotípica e alélicas dos polimorfismos estudados.....	54
4.3. Relação entre polimorfismos <i>SCARB1</i> e perfil lipídico sérico.....	57
4.4. Estudo de haplótipos.....	71
4.5. Estudo da expressão de RNAm do <i>SCARB1</i> em CMSP.....	86
5. DISCUSSÃO.....	95
6. CONCLUSÕES.....	107
7. BIBLIOGRAFIA.....	109
APÊNDICES.....	118
ANEXOS.....	122

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos trinta anos presenciamos o declínio da taxa de mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais dessa taxa têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil (Sposito & Sociedade Brasileira de Cardiologia *et al.*, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa tendência na elevação da prevalência da doença cardiovascular e da aterosclerose tende a persistir, agravando o quadro de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que afeta principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre, caracterizada pela proliferação de células musculares lisas (CML) e depósito de lipídeos que formam placas visíveis (Llorente *et al.*, 1998). O rompimento da placa aterosclerótica formada nesse processo depende mais de sua composição que de seu tamanho, sendo mais vulneráveis as que têm maior conteúdo de colesterol (Fernández-Ortiz *et al.*, 1994). O núcleo lipídico da placa aterosclerótica é composto de lipídeos extracelulares e intracelulares.

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco, tais como elevação de lipoproteínas aterogênicas no plasma, hipertensão arterial, tabagismo, entre outros. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial.

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o aumento da expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície das células endoteliais. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas (Libby, 2006; Sposito *et al.*, 2007). Os macrófagos repletos de lípidos são denominados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Milioti *et al.*, 2008).

Os receptores *scavenger* estão envolvidos na captação e interiorização de lipídeos extracelulares, desempenhando um importante papel na formação da célula espumosa a partir de monócitos/macrófagos e na formação núcleo lipídico da placa aterosclerótica (Wüstner *et al.*, 2005).

Os receptores *scavenger* constituem uma família de proteínas de superfície celular capazes de ligar e interiorizar lipoproteínas modificadas, como LDL acetiladas (AcLDL) e LDL oxidadas (OxLDL) (Rigotti, 2000). Caracterizam-se por sua grande variedade de ligantes específicos que incluem as proteínas modificadas quimicamente (como as lipoproteínas modificadas), polissacarídeos, polirribonucleotídeos, fosfolípidios aniônicos, e outras moléculas aniônicas (Krieger & Herz, 1994). Dessa forma, os receptores *scavenger* desempenham um importante papel na defesa por meio do reconhecimento e eliminação de patógenos e substâncias endógenas e exógenas (Krieger *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1996; Krieger *et al.*, 1997; Greaves *et al.*, 1998).

Os receptores *scavenger* pertencem a uma família de receptores classificados em oito classes (A, B, C, D, E, F, G e H) e estão implicados em um amplo número de funções fisiológicas e fisiopatológicas. Dentre eles, os receptores *scavenger* de classe A e B têm sido amplamente relacionados com a fisiopatologia da aterosclerose (Plüddermann *et al.*, 2007).

1.1. Receptores Scavenger Classe A

Os receptores *scavenger* classe A (SR-A) são glicoproteínas integrais de membrana com um domínio extracelular composto por uma região α -helicoidal e um domínio de colágeno (Krieger *et al.*, 1993). O SR-A tem duas isoformas geradas por processamento alternativo de RNAm, denominadas SR-AI e SR-AII. O SR-AI tem um domínio adicional carboxiterminal rico em cisteína que não está presente no SR-AII. Ambos têm especificidade similar de ligantes e são expressos principalmente em células de linhagem mieloide (Plüddeman *et al.*, 2007).

Os SR-A têm a capacidade de ligar lipoproteínas modificadas, lipopolisacarídeos, ácido lipoteitóico e bactérias gram-positivas, como os *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Plüddemann *et al.*, 2006). Os SR-A podem também mediar a fagocitose das células apoptóticas pelos macrófagos (Todt *et al.*, 2008).

Os SR-A também têm um papel pro-aterogênico, pois ligam com alta afinidade a OxLDL e AcLDL (Plüdemann *et al.*, 2007). Essa característica leva a que a perda de atividade do SR-A resulte na atenuação das lesões ateroscleróticas em camundongos (Manning-Tobin *et al.*, 2008).

1.2. Receptores *Scavenger* Classe B

Os receptores *scavenger* da classe B incluem o receptor CD36 e o receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). O CD36 tem similaridade funcional com os SR-A, mas, além das LDL modificadas, ele também pode ligar LDL natural, contribuindo também na formação de placas ateroscleróticas (Martin *et al.*, 2007).

O SR-BI foi identificado como um receptor para AcLDL, OxLDL e LDL natural (Acton *et al.*, 1994). Estas duas formas modificadas de LDL - AcLDL e OxLDL - são ligantes verdadeiros para os receptores *scavenger*, pois eles não se ligam aos receptores de LDL.

O SR-BI não tem similaridade estrutural com os SR-A. Ele foi descoberto durante o estudo de um receptor *scavenger* com atividade diferente do SR-A e, posteriormente, foi identificado como uma multiproteína que se encontrava no fígado e em glândulas esteroidais de camundongos como um receptor de lipoproteína de alta densidade (HDL) (Acton *et al.*, 1996). Até esse momento, não tinha sido descrito um papel fisiológico específico no metabolismo lipídico para as proteínas candidatas receptores de HDL.

O SR-BI é uma proteína de 82-85 kDa composta por 509 aminoácidos. Estudos da estrutura da proteína mostraram que o SR-BI tem dois domínios transmembrana e duas extremidades citoplasmáticas (Calvo & Vega, 1993; Acton *et al.*, 1994). Os dois domínios transmembrana estão separados por uma grande região extracelular com uma metade carboxiterminal rica em cisteína e sítios de N-glicosilação de potencial múltiplo (Babitt *et al.*, 1997).

O SR-BI tem a capacidade de ligar lipoproteínas modificadas e albumina sérica de bovino metilada (Acton *et al.*, 1994), fosfolipídios aniônicos (Rigotti *et al.*, 1995) e células apoptóticas (Murao *et al.*, 1997). Além disso, o SR-BI também exibe atividade de ligação para lipoproteínas nativas como HDL, LDL e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (Calvo *et al.*, 1997). De fato, o SR-BI foi o primeiro receptor de superfície celular de HDL, bem definido molecularmente e funcionalmente ativo, capaz de mediar a ligação seletiva de HDL (Acton *et al.*, 1996). Este receptor *scavenger*, que inicialmente foi descoberto em camundongos, tem seu homólogo em humanos, CD36 e proteína integral de membrana lisossomal II, análogo 1 (CLA-1) (Calvo & Vega, 1993; Murao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1997). Na ausência de uma nomenclatura unificada, nós nos referiremos ao CLA-1 como SR-BI.

O SR-BI também participa da captação seletiva de HDL em tecidos que produzem hormônios esteroidais, onde são altamente expressos (Landschulz *et al.*, 1996). Também é expresso no saco vitelino e placenta, onde facilita a transferência de HDL colesterol desde a circulação materna ao embrião em desenvolvimento, tendo papel importante na embriogênese (Hatzouponlos *et al.*, 1998).

1.3. Papel do SR-BI no metabolismo lipídico

O transporte do colesterol desde as células periféricas, como as células espumosas do interior das artérias, ao fígado é facilitado pela presença de HDL (Fielding & Fielding, 1995), e é conhecido como o transporte reverso do colesterol (TRC). Nesse processo, o colesterol livre das células dos tecidos

periféricos é transferido para aceptores lipoproteicos, especialmente a apolipoproteína AI (apoAI), inicialmente por interação com o transportador de membrana da família *ATP binding cassette* (ABC), ABCA1, localizado na superfície da célula, formando a HDL nascente (Cucuianu *et al.*, 2007). Entretanto a proteína ABCA1 transfere colesterol não esterificado para a apoAI não associada ou pobremente associada a lipídeos (pré- β -HDL), o SR-BI e o transportador ABCG1 transferem colesterol não esterificado para a HDL nascente.

Nas partículas de HDL nascente, o colesterol não esterificado é convertido em ésteres de colesterol (CE), na superfície da HDL, pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT). O CE é então transferido para o centro hidrofóbico da HDL, que se tornam partículas esféricas maduras conhecidas como HDL₃ (menor e mais densa) e HDL₂ (maior e menos densa) (Davidson & Toth, 2007).

O SR-BI participa dos mecanismos direto e indireto de TRC (**Figura 1**). O mecanismo direto envolve a captação seletiva das HDL maduras do plasma pelos hepatócitos, mediada pelo receptor SR-BI. O SR-BI liga a HDL por meio da interação com a apoAI e o complexo SR-BI/HDL é incorporado no hepatócito num processo mediado por endocitose. Dessa forma, o colesterol da HDL é disponibilizado no *pool* intra-hepático e pode ser convertido em ácidos biliares num mecanismo regulado principalmente pela 7- α -hidroxilase, e posteriormente transportado para os canalículos biliares por intermédio de proteínas de transferência conhecidas como *bile salt export pumps* (BAEP) (Kosters & Karpen, 2008), onde finalmente é excretado pelo sistema biliar. Esse mecanismo de remoção da HDL mediada pelo SR-BI contribui de forma

significativa para a homeostase do colesterol. Dessa forma, o SR-BI desempenha uma importante função anti-aterogênica (Rigotti *et al.*, 2003).

O mecanismo indireto de TRC envolve o intercâmbio entre o colesterol esterificado das HDL plasmáticas e os triglicérides (TG) provenientes das lipoproteínas ricas em apolipoproteína B100 (apo B), como as LDL e VLDL, mediado pela proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). As lipoproteínas ricas em apoB são posteriormente captadas pelos hepatócitos, via receptor de LDL (RLDL) e proteína relacionada ao RLDL (LRP) (Davidson & Toth, 2007). O SR-BI também é capaz de ligar VLDL e LDL na membrana celular dos hepatócitos que são interiorizadas. Assim, o SR-BI contribui com o RLDL e o LPR para o mecanismo indireto de TRC (Trigatti *et al.*, 2004).

A maior parte dos estudos realizados até hoje tiveram como foco o SR-BI como receptor de HDL, mesmo já tendo sido reportado que, junto ao papel no metabolismo da HDL, o SR-BI participa no metabolismo das lipoproteínas contendo apoB (Trigatti *et al.*, 2003), o que pode atribuir uma importância maior a este receptor em modelos de doenças que envolvem concentrações elevadas dessas lipoproteínas.

Figura 1. Papel do SR-BI no transporte reverso do colesterol.

NOTA: LDLR, receptor de LDL; LRP, proteína relacionada ao LDLR; CE, colesterol esterificado; C, colesterol livre.

1.4. Gene *SCARB1*: estrutura e variantes polimórficas

O gene que codifica o SR-BI, também conhecido como SR-BI/CLA-1, é denominado *SCARB1*. Localiza-se na região 12q24 (Cao *et al.*, 1997), tem 86 kb e está composto por 13 éxons (Webb *et al.*, 1997). O RNAm do SR-BI está composto por 2759 pb (NCBI access number, NM_005505). A sua variante por processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm), denominada SR-BII, difere pela omissão do éxon 12 (129 bp), o que leva a mudança de fase de leitura ao éxon 13 (Webb *et al.*, 1998).

Svensson e colaboradores (Svensson *et al.*, 2005) identificaram uma nova isoforma do SR-BI, designada SR-BIII, a qual parece ser gerada por um

sítio receptor de processamento alternativo do RNAm no intron 11. O processamento alternativo do *SCARB1* gera isoformas do receptor que variam em seu domínio intracelular carboxi-terminal, que contêm 47, 44 e 53 aminoácidos, respectivamente, para o SR-BI, SR-BII e SR-BIII. As isoformas do SR-BI foram detectadas tanto em macrófagos como em placas ateroscleróticas (Svensson *et al.*, 2005).

Na **figura 2**, pode-se observar uma representação esquemática da estrutura do gene *SCARB1* e suas variantes por processamento alternativo.

Susan Acton e colaboradores (Acton *et al.*, 1999) estudaram a estrutura do *SCARB1* procurando a presença de polimorfismos mediante uma análise por *single-strand conformation polymorphism* (SSCP) (Orita *et al.*, 1989) em 96 indivíduos. Os pesquisadores encontraram somente polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados nos éxons 1, 3 e 8, e nos introns 5 e 11. Os SNPs presentes no éxon 3 e intron 11 não foram considerados para estudos posteriores devido à sua baixa frequência alélica. O polimorfismo no éxon 1 (c.4G>A) resulta em uma troca aminoacídica de uma glicina por uma serina (p.Gly2Ser). Os SNPs no intron 5 (c.726+54C>T) e no éxon 8 (c.1050C>T) são produtos de substituição de citocina por timina, e a última não resulta em troca de aminoácido. Para simplificar, nós nos referiremos aos SNPs c.4G>A, c.726+54C>T e c.1050C>T como G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

No ano 2004, Le Jossec e colaboradores realizaram uma nova análise de SSCP em 178 amostras, encontrando a presença de 14 SNPs (**figura 2**), confirmando o estudo de Acton e colaboradores e somando 9 polimorfismos sem confirmações anteriores (Le Jossec *et al.*, 2004).

Figura 2. Representação esquemática do *SCARB1*. Extraído de Le Jossec *et al.* (2004).

NOTA: Numeração do cDNA considera 143 nucleotídeos *upstream* do ATG inicial.

Barras horizontais representam os 13 éxons; 1-14, representam os SNPs identificados.

1.5. Relação da variabilidade genética do *SCARB1* com a doença aterosclerótica

Vários polimorfismos do *SCARB1*, principalmente as variantes G4A (c.4G>A, Gly2Ser; rs4238001), In5C>T (c.726+54C>T; rs não informado no NCBI) e Ex8C>T (c.1050C>T, Ala350Ala; rs5888), foram relacionados com o processo aterogênico em diversos estudos (Acton *et al.*, 1999; Osgod *et al.*, 2003; Pérez-Martínez *et al.*, 2003; Rodríguez-Esparragón *et al.*, 2005). Essas pesquisas demonstraram a influência dos polimorfismos no *SCARB1* sobre o metabolismo e o tamanho das lipoproteínas HDL, LDL e VLDL, em resposta ou não a diferentes dietas. Também foi observada relação entre esses polimorfismos e índice de massa corporal (IMC) aumentado e diabetes tipo 2 (DM2).

Acton e colaboradores (1999) conseguiram mostrar associação significativa entre alguns polimorfismos e concentrações de lipídeos e medidas antropométricas que foi específica para o gênero. Em homens, a variante G4A foi associada com concentrações menores de LDL colesterol (LDL-C) e TG, e aumento na concentração de HDL colesterol (HDL-C). Em mulheres, ao contrário, a variante Ex8C>T foi associada com a diminuição na concentração plasmática de LDL-C, e as mulheres portadoras da variante alélica In5T apresentaram IMC aumentado. Além da relação desses polimorfismos com os distintos parâmetros, evidenciou-se a associação de haplótipos com alterações nas concentrações de HDL-C em homens e LDL-C em mulheres.

Rodríguez-Esparragón e colaboradores, em 2005, descreveram pela primeira vez que o polimorfismo Ex8C>T no *SCARB1* contribuía para o risco de doença cardiovascular na população masculina, ainda que suas análises não tenham revelado diferenças significativas entre as variantes genéticas estudadas e o IMC e/ou perfil lipídico.

Foi também demonstrado que o SNP G4A está associado com o metabolismo dos lipídeos quando indivíduos saudáveis foram submetidos a distintas dietas (Pérez-Martínez *et al.*, 2003). Nesse estudo, os portadores da variante 4A que consumiram ácidos graxos saturados na dieta tinham aumento significativo na fração LDL-C.

A relação entre variantes genéticas do *SCARB1* e DM2 também foi estudada. Em uma pesquisa, realizada por Osgood e colaboradores (Osgood *et al.*, 2003) com a população do estudo de Framingham (187 diabéticos e 2463 não-diabéticos), não se encontrou associação significativa entre DM2 e os polimorfismos Ex8C>T e In5C>T, mas concluiu-se que a condição de

diabético modifica o efeito do SNP G4A sobre a concentração plasmática de lipídeos e a distribuição do tamanho de partículas lipoprotéicas. O mesmo estudo avaliou também o efeito de haplótipos sobre os distintos parâmetros analisados, onde homens e mulheres portadores do haplótipo In5C/Ex8T tiveram concentrações mais baixas de LDL-C e maiores tamanhos de partículas de HDL.

Os trabalhos que têm tratado sobre a expressão gênica do *SCARB1* são escassos. Svensson e colaboradores (2005) realizaram estudos sobre a regulação do *SCARB1* em macrófagos humanos cultivados em distintas condições, hipoxia e presença de LDL modificada. Conforme os resultados obtidos pelos pesquisadores, essas duas condições podem modular a expressão do *SCARB1* em macrófagos, sendo a expressão diminuída frente a hipoxia e incrementada pelas LDL modificadas. Apesar dos resultados obtidos, nesse estudo não foram detectadas diferenças significativas na expressão de *SCARB1* entre indivíduos com aterosclerose e controles sãos. Por outro lado, Bonaterra e colaboradores (2006) observaram expressão gênica elevada em células mononucleares periféricas de homens com hiperlipidemia quando comparada à de controles normolipidêmicos.

1.6. Tratamento hipolipemiante

As estatinas são potentes hipolipemiantes que limitam antecipadamente a síntese de colesterol pois reduzem a produção de colesterol endógeno por inibição competitiva de β -Hidroxi- β -metil-glutaril Coenzima A redutase

(HMGCR), enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA a mevalonato (Vaughan & Gotto, 2004). A redução do colesterol intracelular tem como consequência maior produção e exposição de receptores de LDL principalmente em hepatócitos, incrementando assim a remoção plasmática das LDL (Brown & Goldstein, 2004).

A atorvastatina é administrada via oral como sal cálcico da forma ativa hidroxí-ácida que reduz as LDL em 40% a 60% utilizando uma dose única diária de entre 10 e 80 mg (Malinowski, 1998). Esse fármaco é metabolizado primariamente pelas isoformas do citocromo P450, CYP3A4 e CYP3A5, no intestino e fígado, e posteriormente são conjugadas com ácido glicurônico mediado pelas enzimas UDP-glicuronil transferases UGT1A1 e UGT1A3 (Lennernas, 2003). A atorvastatina e seus metabolitos são eliminados principalmente pela bile.

O tratamento farmacológico da hipercolesterolemia com estatinas é de uso comum em pacientes que não respondem à dieta e exercício, mas a resposta clínica à redução do colesterol é altamente variável (LaRosa, 2000; Puccetti *et al.*, 2007). Vários estudos têm mostrado associação de variantes em diversos genes do metabolismo intermediário do colesterol com diferenças na resposta a estatinas (Mangravite *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa realizou estudos em diversos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo intermediário dos lipídeos, tais como os genes do receptor de LDL (*LDLR*), apolipoproteínas B (*APOB*) e A1 (*APOA1*), transportador *ATP-binding cassette* do tipo A1 (*ABCA1*) e fatores de transcrição (*SREBF1* e *SCAP*). Os estudos demonstraram que esses polimorfismos influenciam de alguma forma a resposta ao tratamento com

fluvastatina (Salazar *et al.*, 2000a; Guzmán *et al.*, 2000) e atorvastatina (Sorkin *et al.*, 2005; Arazi *et al.*, 2008; Genvigir *et al.*, 2008).

Os trabalhos que relacionam a variação genética do *SCARB1* com a resposta farmacológica a hipolipemiantes são escassos. Recentemente, Liu e colaboradores estudaram a influência dos SNPs no *SCARB1* com a resposta ao tratamento com fenofibrato, um fármaco hipolipemiante que diminui principalmente a concentração de triglicérides pela ativação PPAR α (Liu *et al.*, 2008). Até o momento, não há estudos que avaliem a influência dos polimorfismos do *SCARB1* sobre a resposta ao tratamento com estatinas.

Han e colaboradores (2004) demonstraram que a pitavastatina pode estimular a expressão da proteína e de RNAm do *SCARB1* em macrófagos *in vitro* pela redução da síntese dos intermediários do colesterol.

Também foram avaliados os efeitos da atorvastatina sobre a expressão do *SCARB1* em modelos animais. Foi demonstrado que a atorvastatina pode aumentar a expressão de RNAm do *SCARB1* em adipócitos de coelhos hipercolesterolêmicos *in vitro* (Zhao *et al.*, 2006). Porém os resultados desse estudo foram questionados pelo Dr. Tancevski (2006) que argumentou que o desenho do experimento não foi o adequado para a detecção do efeito direto da atorvastatina sobre a expressão do *SCARB1*. Por outro lado, recentemente foi informado que o tratamento com sinvastatina não altera a expressão de RNAm do *SCARB1* em indivíduos diabéticos com hiperlipidemia (Guan *et al.*, 2008). Não temos outras informações de trabalhos que avaliem os efeitos das estatinas sobre a expressão do *SCARB1* em humanos.

Considerando o papel fundamental do SR-BI no metabolismo reverso do colesterol e os escassos estudos que avaliam o efeito de fármacos

hipolipemiantes sobre a expressão gênica, é de grande interesse avaliar, na nossa população, os efeitos de polimorfismos e de estatinas sobre a expressão de RNAm do *SCARB1* e a sua relação com a resposta a estes fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos de polimorfismos do *SCARB1* e atorvastatina sobre a expressão gênica em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolemicos e sua relação com a resposta ao tratamento.

2.2. Objetivos específicos

2.1. Determinar as frequências gênicas dos polimorfismos do *SCARB1* em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.

2.2. Avaliar a influência dos polimorfismos do *SCARB1* sobre o perfil lipídico sérico, em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.

2.3. Investigar a relação entre os polimorfismos do *SCARB1* e a resposta ao tratamento com atorvastatina, em indivíduos hipercolesterolêmicos.

2.4. Avaliar a influência dos polimorfismos do *SCARB1* e da atorvastatina sobre a expressão gênica em células mononucleares de sangue periférico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Para este estudo, foram selecionados 332 indivíduos, 99 homens e 233 mulheres, com idade entre 29 e 81 anos. Desses indivíduos, 147 eram hipercolesterolêmicos (HC) e 185 normolipidêmicos (NL). Os indivíduos foram selecionados na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP) e na Seção Médica de Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) de São Paulo.

A seleção dos pacientes HC (LDL colesterol > 160 mg/dL) e NL (LDL colesterol < 130 mg/dL) foi feita de acordo com normas brasileiras para dislipidemias (Sposito & Sociedade Brasileira de Cardiologia *et al.*, 2007) segundo os seguintes critérios:

Critérios de inclusão: LDL colesterol >160 mg/dL e TG <350 mg/dL para o grupo HC, e LDL colesterol <130 mg/dL e TG <150 mg/dL para o grupo NL. Foram incluídos indivíduos fumantes e não fumantes, com e sem hipertensão, e todos eles não apresentavam DAC.

Critérios de exclusão: Foram excluídos do estudo indivíduos com doenças da tireóide, diabetes melito, doença hepática e renal, mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos.

Indivíduos com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m² foram classificados como obesos e aqueles que apresentaram pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 140/90 mmHg ou estavam sob

tratamento anti-hipertensivo foram considerados hipertensos (ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS, 2004).

3.2. Cálculo do tamanho amostral

O tamanho da amostra foi calculado com base na fórmula que permite quantificar a precisão de um método de discriminação para estudos de proporções (Luiz & Magnanini, 2000), como é o caso de análise de frequências de alelos polimórficos.

Para a estimativa do tamanho amostral, foram consideradas as frequências alélicas dos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T descritos no trabalho de Acton e colaboradores (1999) (**tabela 1**). Para o intervalo de confiança (IC) de 90% que corresponde a 10% de erro, são necessários 79 indivíduos para o polimorfismo G4A, 74 indivíduos para o polimorfismo e 184 indivíduos para o polimorfismo Ex8C>T. Para o IC de 95% (erro de 5%), são necessários 113 indivíduos para o polimorfismo G4A, 105 indivíduos para o polimorfismo e 263 indivíduos para o polimorfismo Ex8C>T (Tabela 1).

Para o estudo foram selecionados 332 indivíduos que corresponde a um número maior de indivíduos do que os necessários para a avaliação do polimorfismo Ex8C>T (alelo de maior frequência), considerando-se o IC de 95%.

Tabela 1. Tamanho amostral estimado para o estudo de acordo com as frequências alélicas dos polimorfismos do *SCARB1*

Polimorfismo	Frequência alelo raro*	Número de indivíduos estimados	
		I.C. 90%	I.C. 95%
G4A	12%	79	113
In5C>T	11%	74	105
Ex8C>T	44%	184	263

Nota: I.C., intervalo de confiança. (*) frequências do alelo raro de acordo com Acton *et al.* (1999).

3.3. Protocolo de tratamento

Os indivíduos do grupo HC foram orientados a fazer uso de dieta com baixo conteúdo de colesterol e gorduras saturadas por 4 semanas. Após esse período os indivíduos com concentração sérica de LDL colesterol superior a 160 mg/dL foram tratados com 10mg/dia de atorvastatina por um período de 4 semanas.

3.4. Aspectos éticos

Os indivíduos foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (HU/USP, IDPC e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, **Anexo 1**) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido (**Apêndice A**). Nesse momento, foram obtidos os dados de etnia, sexo, idade, peso, altura, menopausa, tabagismo, hipertensão, história familiar de DAC, prática de exercícios físicos e medicações em uso, de acordo com a ficha para coleta de dados do paciente (**Apêndice B**).

3.5. Amostras biológicas

As amostras de sangue para extração de DNA e RNA, e medições bioquímicas foram coletadas, após jejum de 12-14 horas, mediante punção venosa em tubos com EDTA para extração de DNA (3 mL) e RNA (10 mL), e em tubos sem anticoagulante para as determinações bioquímicas (5 mL). No soro, foram avaliados: o perfil lipídico, as apolipoproteínas (apo) AI e B, e as enzimas creatina quinase (CK) e alanina aminotransferase (ALT), antes e após o tratamento com atorvastatina. As enzimas foram medidas para avaliar a toxicidade potencial da atorvastatina no tecido muscular e hepático.

3.6. Determinações bioquímicas

O colesterol total e triglicérides séricos foram determinados por métodos enzimático-colorimétricos (Fossati & Prencipe, 1982; Siedel *et al.*, 1983), utilizando conjuntos diagnósticos (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), em analisador automático Advia 1650® (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA). A determinação de HDL

colesterol foi realizada por método enzimático (Nauck *et al.*, 1998) com o conjunto diagnóstico da DiaSys® (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemanha). A concentração de LDL colesterol foi calculada pela fórmula de Friedewald e a concentração de VLDL colesterol (VLDL-C) foi estimada em base ao cálculo $VLDL-C = TG/5$ (Friedewald *et al.*, 1972).

As atividades de ALT e CK foram determinadas por métodos cinéticos no UV (Bergmeyer *et al.*, 1978; Horder *et al.*, 1991). Estas análises também foram realizadas em analisador automático Advia 1650® (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA).

As concentrações de apoA1 e apoB foram determinadas por métodos nefelométricos (Rifai & King, 1986), no Laboratório Álvaro (Cascavel, PR), utilizando conjuntos diagnósticos da Dade Behring (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha), em analisador automático BN II® (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha).

3.7. Extração e avaliação de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir do sangue coletado em tubos de 4 mL contendo 7,2 mg de EDTA (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, EUA), usando o método de precipitação salina modificado, desenvolvido em nosso laboratório (Salazar *et al.*, 1998). Resumidamente, as amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10 mmoles/L (pH 8,0), KCl a 10 mmoles/L; $MgCl_2$ a 10 mmoles/L e EDTA a 2 mmoles/L] adicionado de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mmoles/L,

pH 8,0, KCl a 10 mmoles/L, $MgCl_2$ a 10 mmoles/L, EDTA a 2 mmoles/L pH 8,0 e NaCl a 0,4 moles/L) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A seguir, foi adicionado NaCl a 5moles/L e a suspensão foi centrifugada durante 5min a 12000rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5min a 12000rpm, lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10 mmoles/L e EDTA 1 mmol/L (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a $-20^{\circ}C$.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação electroforética em gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mmoles/L, ácido bórico a 45 mmoles/L e EDTA a 1 mmol/L (pH 8,0)] (Sambrook & Russel, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, 60 mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 1000 bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook & Russel, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA). A quantificação e análise de pureza foram realizadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (Sambrook & Russell, 2001) utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA).

3.8. Análise dos Polimorfismos do *SCARB1* por PCR-RFLP

3.8.1. Amplificação do DNA genômico por PCR

Para a análise dos SNPs G4A, In5C>T e Ex8C>T no *SCARB1*, as seqüências polimórficas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com o uso de iniciadores específicos descritos por Acton e colaboradores (1999) e condições experimentais otimizadas no laboratório. As seqüências dos iniciadores e tamanhos dos produtos de PCR são descritos na **tabela 2**.

Tabela 2. Iniciadores e tamanhos de produtos de PCR para análise dos polimorfismos do *SCARB1*

SNP	Iniciadores	Produto de PCR
G4A	Senso: 5'-CCGGCGATGGGGCATAAAACCACT-3' Antisenso: 5'-CGCCCAGCACAGCGCACAGTAGC-3'	263pb
In5C>T	Senso: 5'-GCCCAGAATGTTCAGACCAG-3' Antisenso: 5'-GCACCCTCTTCACGACAAAG-3'	291pb
Ex8C>T	Senso: 5'-CCTTGTTTCTCTCCCATCCTCACTTCCTCAAGGC-3' Antisenso: 5'-CACCACCCCAGCCCACAGCAGC-3'	218pb

NOTA: Seqüências dos iniciadores extraída de Acton *et al.* (1999). SNP: polimorfismo de nucleotídeo único.

Os ensaios de PCR foram realizados em termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc., MA, EUA). As condições otimizadas do ensaio para cada polimorfismo estão representadas na **tabela 3**, e são descritas a seguir:

Resumidamente, foram utilizados de 50 a 100 ng de DNA genômico, iniciadores a 100 - 200 nmoles/L (Invitrogen Corporation, CA, EUA),

desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 200 mmoles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), DNA polimerase 0,5 U e tampão de PCR [Tris-HCl a 75 mmoles/L (pH 9,0), MgCl₂ a 2 mmoles/L, KCl a 50 mmoles/L, sulfato de amônio a 20 mmoles/L] (Biotools, Madrid, Espanha), em volume final de 25 µL completado com água MilliQ autoclavada. A amplificação foi realizada com etapas de desnaturação inicial, 30 ciclos com temperaturas de desnaturação, hibridação dos iniciadores e extensão, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Os tempos e temperaturas para cada etapa são descritas na **tabela 3**.

Devido à alta percentagem de citocinas e guaninas do fragmento amplificado para o polimorfismo G4A, foi necessário o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar a desnaturação do DNA.

Tabela 3. Condições de PCR para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T

Condições	Polimorfismos		
	G4A	In5C>T	Ex8C>T
DNA genômico	50 ng	50 ng	100 ng
Iniciadores	200 nmoles/L	200 nmoles/L	100 nmoles/L
Aditivos	DMSO a 5%	-	-
Amplificação			
Desnaturação inicial	98°C (3 min)	98°C (3 min)	96°C (6 min)
Desnaturação	94°C (1 min)	94°C (1 min)	96°C (1,5 min)
Hibridação	65°C (1 min)	58°C (1 min)	68°C (45 seg)
Extensão	72°C (1 min)	72°C (1 min)	72°C (1 min)
Extensão final	72°C (10 min)	72°C (10 min)	72°C (10 min)

NOTA: DMSO, dimetilsulfóxido. O tempo das etapas de amplificação é indicado em parêntesis.

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1.0%, utilizando tampão TBE 0,5X, sob as mesmas condições eletroforéticas e visualizados como descrito no item 3.7. Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

3.8.2. Ensaios de RFLP

Os polimorfismos do *SCARB1* foram detectados por RFLP – *Restriction fragments lenght polymorphism*. Os produtos de PCR foram digeridos com as endonucleases *AluI*, *Apal* e *HaeIII* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente (Acton *et al.*, 1999). Os ensaios foram realizados em volume final de 10 µL.

Produtos de PCR específicos para cada um dos polimorfismos foram digeridos com quantidade necessária das enzimas acima assinaladas em condições de temperatura recomendadas pelo fabricante (**tabela 4**), gerando fragmentos de 263, 192 e 71 pares de bases para o polimorfismo G4A (**figura 3**); 194, 97, 67 e 30 pb para o polimorfismo In5C>T (**figura 4**); e 154, 64, 33 e 31 pb para o polimorfismo Ex8C>T (**figura 5**).

Frente a ausência de um sitio constitutivo no produto de PCR para o polimorfismo G4A, uma amostra homozigota para o alelo 4A foi utilizada como controle para cada conjunto de reações de restrição. O fragmento de 194 pb do polimorfismo In5C>T, gerado pelo sitio constitutivo, foi visualizado em todas as amostras. Para o polimorfismo Ex8C>T, os dois fragmentos menores (31 e 33) foram visualizados como um único fragmento e o fragmento de 154 pb foi

visualizado em todas as amostras, já que era gerado pelo sitio constitutivo.

Tabela 4. Condições dos ensaios de RFLP para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T.

	Polimorfismos		
	G4A	In5C>T	Ex8C>T
Enzima	<i>AluI</i>	<i>Apal</i>	<i>HaeIII</i>
Concentração da enzima	5 U	12,5 U	5 U
Produto de PCR	3,5 µL	5 µL	6 µL
Temperatura	37 °C	25 °C	37 °C
Tempo	2 h	4 h	2 h
Fragmentos gerados	263 pb	194 pb	154 pb
	192 pb	97 pb	64 pb
	71 pb	67 pb	33 pb
		30 pb	31 pb

NOTA: pb, pares de bases.

Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, em TBE 0,5 X, utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Göttingen, Alemanha). As eletroforeses foram realizadas com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) realizadas a 150 V e 30 mA durante 1 h e 45 min. Foi utilizado um marcador de tamanho de DNA de 50 bp para determinação do tamanho dos fragmentos. O gel foi posteriormente corado em brometo de etídio 0,5 mg/mL e visualizado no transluminador UV e fotodocumentado como descrito no item 3.7.

Nas **figuras 3, 4 e 5** são apresentados o produto de PCR e os perfis de restrição enzimática, em gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL, para os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

O sucesso da genotipagem foi controlado incluindo uma amostra homozigota para o sitio de restrição como controle positivo. Adicionalmente, todas as amostras genotipadas foram re-analisadas por um segundo observador e 10% das amostras foram repetidas aleatoriamente.

Figura 3. Produtos de restrição do SNP *SCARB1* G4A com a enzima de restrição *AluI*.
NOTA: Linha 1: produto de PCR; linha 2: marcadores de tamanho de DNA de 50bp; linha 3: genótipo GG; linha 4: genótipo GA; linha 5: genótipo AA.

Figura 4. Produtos de restrição do SNP *SCARB1* In5C>T com a enzima de restrição *ApaI*. Linha 1: produto de PCR; linha 2: marcadores de tamanho de DNA de 50bp; linha 3: genótipo CC; linha 4: genótipo CT; linha 5: genótipo TT.

Figura 5. Produtos de restrição do SNP *SCARB1* Ex8C>T com a enzima de restrição *HaeIII*. Linha 1: produto de PCR; linha 2: marcadores de tamanho de DNA de 50bp; linha 3: genótipo CC; linha 4: genótipo CT; linha 5: genótipo TT.

3.9. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (Salazar *et al.*, 2000b). 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 10mM, pH 7,4 e EDTA a 10mM, 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 e contadas em câmara de Neubauer, e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

3.10. Extração e avaliação de RNA total

De acordo ao procedimento previamente descrito por Salazar *et al.* (2000b), as células mononucleares (1 a 5×10^6 células/mL) foram lisadas com 1 mL de TRIZOL^R (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Em resumo, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 *g* por 15 min., a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa, foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 *g* por 10 min., a 4°C, e lavado com etanol a 75% (v/v). Posteriormente, o RNA foi seco a temperatura ambiente e diluído em 100 µL água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), e armazenado a -70°C, para posterior análise.

O RNA extraído foi quantificado (A_{260nm}), sendo avaliado o grau de pureza (A_{260}/A_{280}) por espectrofotometria no UV (Sambrook & Russell, 2001), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo formaldeído a 2,2M e tampão MOPS [MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] preparado com água esterilizada tratada com DEPC (Sambrook & Russell, 2001).

3.11. Quantificação da Expressão gênica por RT-PCR em tempo real

A quantificação do RNAm do gene *SCARB1* em CMSP foi realizada por transcrição reversa seguido de PCR (RT-PCR) em tempo real, utilizando-se o sistema de amplificação *TaqMan RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA). O ensaio utiliza uma sonda oligonucleotídica marcada com um emissor de fluorescência (*reporter dye*) e um bloqueador (*quencher dye*). Durante a etapa de polimerização do ensaio de PCR, a sonda hibridizada no DNA sofre ação exonucleásica da DNA polimerase liberando o emissor cuja fluorescência é imediatamente detectada.

3.11.1. Obtenção do cDNA

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, CA, EUA), ditiotreitól (DTT) a 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, CA, EUA), dNTPs a 500 µmoles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200 U de

transcriptase reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl a 250 mmoles/L (pH 8,3), KCl a 375 mmoles/L e MgCl₂ 15 mmoles/L] (Invitrogen Corporation, CA, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., 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 armazenado a -20°C até a realização da PCR em tempo real.

3.11.2. Ensaios de PCR em tempo real

A análise de expressão de RNAm do gene *SCARB1* foi realizada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan® RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)

Com a finalidade de selecionar o gene constitutivo mais estável para nosso modelo experimental, foram testados os genes da β -2-microglobulina (*B2M*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPD*), hidroximetil-bilano sintase (*HMBS*), hipoxantina-fosforribosil transferase I (*HPRTI*), succinato desidrogenase subunidade A (*SDHA*) e ubiquitina c (*UBC*). Pela análise dos resultados empregando-se o programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), verificou-se que o *UBC* apresentou a menor variabilidade de expressão de RNAm, antes e após o tratamento com atorvastatina. Portanto, foi o gene escolhido como referência endógena para o estudo da expressão relativa de RNAm.

As características dos iniciadores e das sondas TaqMan para os ensaios de PCR em tempo real estão descritas na **tabela 5**. Iniciadores e sondas para estudo expressão de *SCARB1* foram obtidos no serviço “Assay on demand”

como ensaio previamente desenhados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e fornecidas em solução 20 vezes concentrada. No ensaio de PCR em tempo real de *UBC* utilizou-se cada iniciador a 300 nmol/L e sonda a 400 nmol/L.

Os demais reagentes (*Master Mix*) foram fornecidos em solução 2x contendo dNTPs com dUTP (desoxiuridina trifosfato), AmpErase® UNG (Uracil N-glicosilase), enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, uma referência passiva (ROX) e tampão de reação *Gold PCR Buffer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado volume final de 10 µL por reação. Todas as determinações foram realizadas em duplicata e foi incluído um tubo no qual não foi adicionado cDNA como controle negativo para cada corrida.

A amplificação foi realizada no equipamento ABI Prism 7500 Fast (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 1 ciclo de 2 min a 50°C para ativação da UNG (evita contaminação com fragmentos pre-amplificados que contêm dUTP); 1 ciclo de 10 min a 95°C para inativação da UNG, (3) 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados em tempo real pelo equipamento ABI Prism 7500 Fast. Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* (SDS) v1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A expressão de RNAm do *SCARB1* foi estimada pelo o método do Ct comparativo, utilizando-se a fórmula: expressão relativa = $2^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001; Livak & Schmittgen, 2001), sendo que o ΔCt representa a diferença entre o Ct do gene alvo (*SCARB1*) e o Ct do gene endógeno (*UBC*), obtidos na fase

logarítmica da reação de amplificação. Previamente, foram calculadas as eficiências de ambos os ensaios, sendo considerados adequados valores de inclinação da curva (*slope*) próximos a -3,3 com eficiência entre 90% e 110%, para a validação do método (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 5. Características de sondas e iniciadores para ensaios de PCR em tempo real para os genes *UBQ* e *SCARB1*.

Gene	Emissor	Sequências	Bloqueador	Produto de PCR
<i>UBQ</i>	VIC	Senso: 5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTTG-3' Antisenso: 5'-TGCCTTGACATTCTCGAT GGT-3' Sonda: 5'-TCG TCA CTT GAC AAT GC-3'	MGB-NFQ	133bp
<i>SCARB1</i>	FAM	Assay ID: Hs00194092_m1	MGB-NFQ	81bp

Nota: MGB-NFQ, *minor groove binder non fluorescent quencher* (sonda com cauda MGB que bloqueia ao fluoróforo emissor sem emitir fluorescência e permite aumentar a especificidade); FAM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; VIC, fluoróforo disponibilizado pela Applied Biosystems.

3.12. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa *Sigma Stat software for Windows* versão 3.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente na etapa basal e após o tratamento com atorvastatina. Para a análise da influência dos

polimorfismos G4A e In5C>T sobre os diferentes parâmetros analisados, os indivíduos heterozigotos foram agrupados com os homozigotos para o alelo menos freqüente para aumentar a potência dos testes estatísticos, devido à baixa freqüência desses SNPs.

As variáveis categóricas, bem como as freqüências genotípicas e alélicas, foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. Também foram calculados a razão de probabilidade (OR - *Odds Ratio*) e seu intervalo de confiança de 95% (95% I.C.) associado às diferentes variáveis.

O programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi utilizado para o cálculo das freqüências haplotípicas e do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). As freqüências dos haplótipos foram obtidas usando o algoritmo *Expectation-Maximation* (EM) (Excoffier & Slatkin, 1995). Para o cálculo do HWE foi utilizado o Teste exato usando a cadeia de Markov (Guo & Thompson, 1992), que é um método de organização de variáveis aleatórias.

Para a análise do desequilíbrio de ligação foi calculado o coeficiente D' de Lewonstin para cada par de SNPs utilizando o programa *SNPAnalyzer* (Yoo *et al.*, 2005), sendo considerado como valor de corte para dois SNP em desequilíbrio de ligação $D' \geq 0,5$.

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) foi utilizado para a avaliação da distribuição das variáveis contínuas. Aquelas que tiveram uma distribuição assimétrica foram transformadas em logaritmo com base 10 (Log), com exceção da variável de expressão de RNAm. As variáveis transformadas foram novamente submetidas ao teste de normalidade K-S.

Os efeitos dos polimorfismos ou haplótipos sobre os parâmetros bioquímicos e resposta à atorvastatina foram analisados utilizando-se os testes

t de Student e de medidas repetidas de ANOVA, seguido de teste de Tukey. No grupo HC, as comparações entre valores basais e após tratamento foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student para amostras pareadas. Os valores de expressão gênica foram comparadas utilizando os testes não paramétricos *Mann-Whitney Rank Sum* ou ANOVA *on ranks*, e teste de *Wilcoxon* para as amostras pareadas. O nível de significância selecionado foi de 5% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos dos grupos estudados

As medidas antropométricas e os parâmetros bioquímicos dos grupos HC e NL são mostrados na **tabela 6**. Como esperado os pacientes HC têm um perfil lipídico mais aterogênico que os indivíduos NL, mostrando valores mais elevados de colesterol total, LDL-C, VLDL-C, triglicérides e apoB, assim como valores aumentados de IMC e razão apoB/apoAI que os indivíduos NL.

A média de idade no grupo HC foi maior que no grupo NL ($p > 0,001$), provavelmente devido a que as alterações características da hipercolesterolemia atingem a um grupo etário de idade mais avançada. As frequências das variáveis: gênero, hipertensão, hábito de fumar e prática de exercício físico foram similares em ambos os grupos ($p > 0,05$). Observou-se maior frequência de indivíduos obesos no grupo HC quando comparada com o grupo NL ($p = 0,005$), como também uma tendência a maior de história de DAC no grupo HC ($p = 0,054$).

4.1.1. Resposta ao tratamento com atorvastatina

Como observado também na **tabela 6**, o tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina durante quatro semanas, reduziu significativamente os valores de colesterol total, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, TG e apoB ($p < 0,05$). Por outro lado os valores de ApoAI que não mostraram este comportamento. A razão

ApoB/ApoAI também mostrou uma diminuição significativa em resposta ao tratamento.

Para a avaliação de reações adversas do tratamento com atorvastatina, foram analisadas as atividades de CK e ALT, como marcadores de dano muscular e hepático, respectivamente. Como critério de hepatotoxicidade foi considerado o valor de três vezes acima do limite superior de referência (LSR) de ALT, e acima de 10 vezes do LSR de CK para miotoxicidade (Martinez & Nascimento, 2005). Após o tratamento com atorvastatina, não houve indivíduos que apresentaram valores superiores aos estabelecidos de CK e ALT como marcadores de reação adversa ao tratamento.

Tabela 6. Características antropométricas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos

Parâmetro	NL (185)	HCb (147)	P ^a	HCp10	P ^b
Idade (anos)	47 ± 7	57 ± 11	<0,001 [#]	-	-
Etnia (branco/negro) (%)	62/38	68/32	0,337		
Mulheres/homens (%)	73/27	67	0,260	-	-
Menopausa (%)	27	83	<0,001 [#]		
Historia de DAC (%)	45	56	0,054	-	-
Hipertensão (%)	36	30	0,254	-	-
Obesidade (%)	16	30	0,005 [#]	-	-
Fumantes (%)	19	17	0,759	-	-
Atividade Física (%)	48	51	0,759	-	-
IMC (kg/m ²)	26,3 ± 4,2	27,9 ± 4,2	<0,001*	-	-
Colesterol total (mg/dL)	173 ± 19	280 ± 37	<0,001*	197 ± 30	<0,001*
LDL-C (mg/dL)	98 ± 18	192 ± 34	<0,001**	117 ± 27	<0,001**
HDL-C (mg/dL)	58 ± 12	57 ± 14	0,257	54 ± 13	<0,001**
Triglicérides (mg/dL)	82 ± 27	157 ± 65	<0,001**	131 ± 54	<0,001**
VLDL-C (mg/dL)	16 ± 5	31 ± 13	<0,001**	26 ± 11	<0,001**
ApoAI (mg/dL)	141 ± 26	135 ± 26	0,045**	138 ± 28	0,074
ApoB (mg/dL)	84 ± 23	142 ± 27	<0,001**	98 ± 20	<0,001**
ApoB/apoAI	0,63 ± 0,22	1,09 ± 0,26	<0,001*	0,74 ± 1,20	<0,001*

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por teste t (P^a) e teste t pareado (P^b) para variáveis com distribuição normal (*) e transformadas em Log (**) (p<0,05). As variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado ([#], p<0,05). NL, Normolipidêmicos; HCb, Hipercolesterolêmicos antes do tratamento; HCp10, Hipercolesterolêmicos após o tratamento; DAC, Doença Arterial Coronariana; IMC, índice de massa corporal; P^a, NL vs HCb; P^b, HCb vs HCp10.

4.2. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados

As frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos do *SCARB1* são apresentadas nas **tabelas 7 a 9**. A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o programa arlequin 3.11 demonstrou que os três SNPs estudados estavam em condições de equilíbrio ($p > 0,05$), em ambos os grupos ($p > 0,05$). Isto indica que a seleção dos indivíduos participantes do estudo foi adequada.

As frequências genótípicas e alélicas para os SNPs *SCARB1* G4A (**tabelas 7**), Int5 C>T (**Tabela 8**) e Ex8C>T (**Tabela 9**), foram similares entre os grupos NL e HC ($p > 0,05$). O cálculo de razão de probabilidade de risco (*Odds Ratio*, *OR*) confirmou a ausência de associação entre esses polimorfismos e a hipercolesterolemia.

Na **tabela 10**, é apresentado um quadro comparativo das frequências alélicas para os polimorfismos estudados, comparando-as com as de outras populações. É importante considerar que ainda são escassos os estudos realizados em populações africana e asiática. Nossos resultados das frequências dos alelos raros dos polimorfismos G4A e In5C>T são concordantes com as frequências obtidas por trabalhos nas populações européia e norte-americana (Acton *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 2003; Osgood *et al.*, 2003). Por outro lado, as frequências do polimorfismo Ex8C>T foram diferentes ($p < 0,001$) entre as populações, sendo que nossa população mostrou menor frequência que os estudos nas populações norte-americana e maior que a africana, entretanto as frequência do alelo Ex8T foi similar à encontrada nas populações européia e asiática. Os resultados das comparações com as populações asiática e africana podem estar influenciados pelo pequeno número de indivíduos estudados (Le Jossec *et al.*, 2004).

Tabela 7. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo *SCARB1* G4A, em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos

Grupos	Genótipo			Alelos	
	GG	GA	GA	G	A
HC (147)	76,2% (112)	23,1% (34)	0,7% (1)	87,8%	12,2%
NL (185)	72,4% (134)	26,0% (48)	1,6% (3)	85,4%	14,6%
	$\chi^2= 1,022, 2gl$, P=0,600			$\chi^2= 0,584, 1gl$, P=0,445	
EHW	NL: P = 0,77289 - HC: P = 0,69787				
OR	0,82 (95% IC: 0,52 - 1,28)				

Nota: Número de indivíduos em parêntesis; gl, graus de liberdade; EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos.

Tabela 8. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo *SCARB1* In5C>T, em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos

Grupos	Genótipo			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
HC (147)	85,7%(126)	14,3%(21)	0%(0)	92,9%	7,1%
NL (185)	86,5%(160)	13,0%(24)	0,5%(1)	93,0%	7,0%
	$\chi^2= 0,904, 2gl$, P=0,636			$\chi^2= 0,00893, 1gl$, P=0,925	
EHW	NL: P = 1,0 - HC: P = 1,0				
OR	1,02 (95% IC: 0,56 - 1,85)				

Nota: Número de indivíduos em parêntesis; gl, graus de liberdade; EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confiança. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos.

Tabela 9. Freqüências genótípicas e alélicas para o polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T, em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos

Grupos	Genótipo			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
HC (147)	38,1%(56)	44,9%(66)	17%(25)	60,5%	39,5%
NL (185)	43,2%(80)	44,3%(82)	12,5%(23)	65,4%	34,6%
	$\chi^2= 1,722$, 2gl , P=0,423			$\chi^2= 1,463$, 1gl, P=0,211	
EHW	NL: P = 0,74227 - HC: P = 0,49147				
OR	1,23 (95% IC: 0,90 - 1,69)				

Nota: Número de indivíduos em parêntesis; gl, graus de liberdade; EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos.

Tabela 10. Freqüências alélicas de polimorfismos *SCARB1* em diferentes populações

População	N	G4A	In5C>T	Ex8C>T	Referência
Européia	489	12%	11%	44%	Acton <i>et al.</i> (1999)
	36	8%	-	50%	Le Jossec <i>et al.</i> (2004)
Norte-americana	2650	13%	9%	49%	Osgood <i>et al.</i> (2003)
	371	12%	8%	51%	McCarthy <i>et al.</i> (2003)
Africana	36	6%	-	20%	Le Jossec <i>et al.</i> (2004)
Asiática	18	-	-	28%	Le Jossec <i>et al.</i> (2004)
Neste estudo	332	13%	7%	37%	-
		$\chi^2 = 4,203$, 5gl, P=0,521	$\chi^2 = 1,096$, 3gl, P=0,778	$\chi^2 = 35,809$, 6gl, P<0,001	

Nota: Freqüência alelo Ex8T neste estudo vs populações Européia ($\chi^2 = 2,678$, 2gl, P=0,262), Norte-Americana ($\chi^2 = 10,281$, 2gl, P=0,006), Africana ($\chi^2 = 13,974$, 1gl, P<0,001) e Asiática ($\chi^2 = 1,575$, 1gl, P=0,209). gl: graus de liberdade.

4.3. Relação entre polimorfismos *SCARB1* e perfil lipídico sérico

4.3.1. Polimorfismo *SCARB1* G4A

A relação entre o polimorfismo *SCARB1* G4A e os valores médios de IMC e concentrações séricas de lipídeos, assim como as características gênero e hipertensão nos grupos NL e HC estão representadas nas **tabelas 11 e 12**, respectivamente. Devido à baixa frequência da variante alélica A, os indivíduos heterozigotos foram agrupados com os pacientes homozigotos para o alelo A, para assim, aumentar a potência dos testes estatísticos.

Os indivíduos do grupo NL com o genótipo 4GG apresentaram maior frequência hipertensão ($p=0,008$) e maior concentração de apoAI sérica ($p=0,038$) que os portadores do genótipo 4GA+AA (**tabela 11, figura 6**). Por outro lado, a distribuição de gênero foi similar entre os genótipos.

No grupo HC, não foi observada relação do polimorfismo *SCARB1* G4A e as variáveis categóricas e o perfil lipídico sérico basal ou após o tratamento com atorvastatina (**tabela 12, figuras 7A e 7B**)

Tabela 11. Relação do SNP *SCARB1* G4A com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.

Parâmetro	GG (134)	GA+AA (51)	P
Mulheres/homens (%)	72/28	76/24	0,634
Hipertensão (%)	42	20	0,008
IMC (kg/m ²)	26,6±4,4	25,7±3,6	0,228
Colesterol total (mg/dL)	173±18	172±20	0,939
LDL-C (mg/dL)	97±18	100±19	0,345
HDL-C (mg/dL)	59±13	56±11	0,314
VLDL-C (mg/dL)	17±5	16±5	0,292
Triglicérides (mg/dL)	83±27	78±26	0,292
ApoAI (mg/dL)	144±28	135±22	0,038*
ApoB (mg/dL)	84±23	86±21	0,503
ApoB/apoAI	0,62±0,23	0,65±0,19	0,134

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por teste t (*) ($p < 0,05$). As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Tabela 12. Relação do SNP *SCARB1* G4A com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.

Parâmetro	Fase	GG (112)	GA+AA (35)	P
Mulheres/homens (%)	-	67/33	66/34	0,945
Hipertensão (%)	-	60	49	0,320
IMC (Kg/m ²)	basal	28,1±4,2	27,3±4,3	0,321
Colesterol Total	basal	279±37	282±36	0,604
(mg/dL)	Tratamento	195±31	204±29	0,206
	% de variação	-30±9	-28±9	0,224
LDL-C	basal	191±33	195±35	0,526
(mg/dL)	Tratamento	115±27	120±27	0,432
	% de variação	-39±12	-38±11	0,628
HDL-C	basal	56±14	57±13	0,628
(mg/dL)	Tratamento	54±13	56±13	0,519
	% de variação	-3±10	-3±11	0,695
VLDL-C	basal	32±12	30±16	0,288
(mg/dL)	Tratamento	26±10	27±13	0,834
	% de variação	-15±27	-6±32	0,123
Triglicérides	basal	159±61	152±79	0,228
(mg/dL)	Tratamento	129±50	136±66	0,834
	% de variação	-15±27	-6±32	0,123
ApoAI	basal	134±26	139±26	0,296
(mg/dL)	Tratamento	136±28	143±28	0,190
	% de variação	2±11	3±13	0,657
ApoB	basal	142±24	141±35	0,528
(mg/dL)	Tratamento	98±21	100±18	0,464
	% de variação	-31±12	-27±14	0,098
apoB/apoAI	Basal	1,10±0,26	1,04±0,27	0,181
	Tratamento	0,75±0,20	0,73±0,19	0,539
	% de variação	-32±11	-28±18	0,719

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por teste t de student. As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. Valores negativos (-) de % de variação representam redução. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 6. Relação do SNP *SCARB1* G4A com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste t. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 7. Relação do SNP *SCARB1* G4A com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste t. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

4.3.2 Polimorfismo *SCARB1* In5C>T

A relação entre o polimorfismo *SCARB1* In5C>T e os valores médios de índice de massa corporal e concentrações séricas de lipídeos, assim como as características de gênero e hipertensão de acordo com o genótipo para os grupos NL e HC estão representadas nas **tabelas 13 e 14**, respectivamente. Devido à baixa frequência da variante alélica T, os indivíduos heterozigotos foram agrupados com os pacientes homozigotos para o alelo T, para assim, aumentar a potência dos testes estatísticos.

As medidas antropométricas e a distribuição segundo o gênero, não mostraram diferenças nos diferentes grupos estudados de acordo com o genótipo para o polimorfismo.

Os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT, apresentaram valores basais de LDL-C significativamente mais altos no grupo NL ($p=0,027$) (**tabela 13, Figura 8**).

No grupo HC, os indivíduos portadores dos genótipos In5CT/TT mostraram apoB sérica ($p=0,029$) e razão apoB/apoAI ($p=0,015$) basais maiores que os portadores de In5CC (**tabela 14, figura 9A**). Após o tratamento com atorvastatina, o LDL-C sérico e a razão apoB/apoAI foram maiores nos portadores do genótipo CT/TT que nos com genótipo CC ($p<0,05$) (**tabela 14, figura 9B**).

Tabela 13. Relação do SNP *SCARB1* In5C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.

Parâmetro	CC (160)	CT+TT (25)	P
Mulheres/homens (%)	63/33	84/16	0,079
Hipertensão (%)	39	20	0,110
IMC (Kg/m ²)	26,2±4.1	26,8±4.9	0,598
Colesterol total (mg/dL)	172±19	177±17	0,257
LDL-C (mg/dL)	97±18	106±17	0,027*
HDL-C (mg/dL)	58±12	56±11	0,293
VLDL-C (mg/dL)	17±5	15±5	0,381
Triglicérides (mg/dL)	83±27	77±25	0,381
ApoAI (mg/dL)	142±28	135±17	0,403
ApoB (mg/dL)	83±22	91±26	0,109
ApoB/apoAI	0,62±0,22	0,69±0,22	0,136

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por teste t (*) ($p < 0,05$). As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Tabela 14. Relação do SNP *SCARB1* In5C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.

Parâmetro	Fase	In5CC (126)	In5CT+TT (21)	P
Mulheres/homens (%)	-	69/31	52/48	0,211
Hipertensão (%)	-	58	50	0,644
IMC (Kg/m ²)	basal	27,7±4,1	28,8±5,0	0,321
Colesterol Total (mg/dL)	basal	279±35	283±47	0,780
	tratamento	196±30	205±31	0,212
	% de variação	-29±9	-27±8	0,272
LDL-C (mg/dL)	basal	190±32	201±41	0,189
	tratamento	115±27	128±25	0,029**
	% de variação	-39±13	-36±9	0,239
HDL-C (mg/dL)	basal	57±14	52±11	0,083
	tratamento	55±13	50±11	0,096
	% de variação	-3±11	-3±8	0,869
VLDL-C (mg/dL)	basal	32±13	30±12	0,724
	tratamento	26±11	27±11	0,725
	% de variação	-13±29	-9±21	0,510
Triglicérides (mg/dL)	basal	158±66	152±61	0,724
	tratamento	130±54	135±57	0,725
	% de variação	-13±29	-9±21	0,510
ApoAI (mg/dL)	basal	137±27	126±21	0,087
	tratamento	139±29	129±22	0,130
	% de variação	2±12	2±11	0,921
ApoB (mg/dL)	basal	140±24	155±37	0,034**
	tratamento	97±20	105±18	0,089
	% de variação	-30±12	-30±12	0,992
apoB/apoAI	Basal	1,07±0,26	1,22±0,20	0,015*
	tratamento	0,73±0,20	0,83±0,16	0,032*
	% de variação	-31±14	32±11	0,687

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por teste t para variáveis com distribuição normal (*) e transformadas em Log (**) (p<0,05). Valores negativos (-) de % de variação representam redução. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 8. Relação do SNP *SCARB1* In5C>T com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste t. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

A

B

Figura 9. Relação do SNP *SCARB1* In5C>T com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste t. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

4.3.3. Polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T

Nas **tabelas 15 e 16** são apresentadas as frequências de gênero e hipertensão, como também os valores médios de IMC e concentrações de lipídeos séricos, segundo o genótipo do polimorfismo Ex8C>T do gene *SCARB1*, para o grupo HC e NL, respectivamente.

Para os indivíduos NL, não foram observadas diferenças nas variáveis categóricas e perfil lipídico sérico quando foi analisada a influência dos distintos genótipos do polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T (**tabela 15 e figura 10**). Da mesma forma, no grupo HC não foi observada relação do polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T e as variáveis categóricas e o perfil lipídico sérico basal (**tabela 16 e figura 11A**).

Após o tratamento com atorvastatina, os indivíduos HC portadores do genótipo Ex8TT apresentaram valores menores de LDL-C quando comparados aos portadores dos genótipos CC e CT ($P=0,029$) (**tabela 16, figura 11B**). Além disso, a redução do colesterol total, LDL-C e apo B séricos e a razão apoB/apoAI foram mais acentuadas nos portadores do genótipo TT ($p<0,05$) que nos demais genótipos (**tabela 16, figura 12**).

Tabela 15. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em normolipidêmicos.

Parâmetro	CC (80)	CT (82)	TT (23)	P
Mulheres/homens (%)	71/29	77/23	65/35	0,487
Hipertensão (%)	39	33	36	0,646
IMC (Kg/m ²)	26,2±4,6	26,1±3,9	27,1±4,1	0,587
Colesterol total (mg/dL)	170±18	176±18	170±22	0,143
LDL-C (mg/dL)	97±18	99±19	99±20	0,806
HDL-C (mg/dL)	58±12	59±12	54±13	0,129
VLDL-C (mg/dL)	16±6	17±5	17±6	0,197
Triglicérides (mg/dL)	78±28	85±25	84±29	0,197
ApoAI (mg/dL)	140±26	142±27	140±28	0,900
ApoB (mg/dL)	83±20	86±26	82±18	0,735
apoB/apoAI	0,62±0,21	0,63±0,23	0,62±0,23	0,900

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA. As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Tabela 16. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com gênero, hipertensão, perfil lipídico sérico e valores de IMC em hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.

Parâmetro	Fase	Ex8CC (56)	Ex8CT (66)	Ex8TT (25)	P
Mulheres/homens (%)	-	64/36	68/32	68/32	0,891
Hipertensão (%)	-	60	51	68	0,291
IMC (Kg/m ²)	basal	28,1±4,4	27,5±3,9	28,5±4,6	0,542
Colesterol Total	basal	279±37	277±39	289±30	0,263
(mg/dL)	Tratamento	201±30	197±32	191±27	0,442
	% de variação	-28±9 ^a	-29±9 ^{a,b}	-33±10 ^b	0,032*
LDL-C	basal	192±35	191±34	193±32	0,935
(mg/dL)	Tratamento	120±26 ^a	119±28 ^a	104±21 ^b	0,029*
	% de variação	-37±12 ^a	-38±12 ^a	-46±11 ^b	0,005*
HDL-C	basal	58±14	55±12	59±15	0,300
(mg/dL)	Tratamento	56±14	52±11	57±13	0,118
	% de variação	-2±11	-4±11	-3±7	0,674
VLDL-C	basal	30±12	31±12	36±16	0,153
(mg/dL)	Tratamento	25±10	26±10	30±15	0,146
	% de variação	-15±23	-11±32	-13±30	0,707
Triglicérides	basal	149±62	155±62	181±78	0,153
(mg/dL)	Tratamento	123±51	129±45	152±77	0,145
	% de variação	-15±23	-11±32	-13±30	0,707
ApoAI	basal	137±28	133±26	138±25	0,558
(mg/dL)	Tratamento	138±29	136±27	140±30	0,845
	% de variação	1±11	3±13	1±10	0,560
ApoB	basal	142±32	142±24	144±23	0,951
(mg/dL)	Tratamento	101±21	99±18	92±21	0,167
	% de variação	-28±14 ^a	-30±11 ^{a,b}	-36±13 ^b	0,031*
apoB/apoAI	Basal	1,08±0,27	1,10±0,26	1,08±0,26	0,857
	Tratamento	0,77±0,20	0,75±0,20	0,68±0,18	0,143
	% de variação	-28±16 ^a	-31±11 ^{a,b}	-36±12 ^b	0,033*

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA seguido do teste de Tukey (*) (p<0,05). Valores negativos (-) de % de variação representam redução. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa (p<0.05). IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 10. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com perfil lipídico sérico em indivíduos normolipidêmicos. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste de ANOVA. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 11. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com perfil lipídico sérico em hipercolesterolêmicos, antes (A) e após (B) o tratamento com atorvastatina. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Figura 12. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com percentagem de variação nos valores de lípidos em indivíduos hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

4.3.4. Relação dos polimorfismos do *SCARB1* com a resposta à atorvastatina

Com a finalidade de avaliar o uso dos SNPs estudados como marcadores úteis na predição da resposta ao tratamento com atorvastatina, os indivíduos HC foram agrupados em três faixas de percentagem de redução do LDL-C sérico. Os valores de redução de LDL-C variaram entre 7% e 62% e foram agrupados de acordo como tercil de resposta. O primeiro tercil foi composto por indivíduos com redução de LDL-C inferior a 34% ($R < 34$). O segundo tercil foi constituído por indivíduos com redução de LDL-C entre 34%

e 44% (**R34-44**). O tercil com resposta mais acentuada foi formado por indivíduos com redução de LDL-C superior a 44% (**R>44**).

Os dados dos indivíduos HC no menor tercil de resposta à atorvastatina (**R<34**) foram comparados com os dos tercis intermediário e superior (**R34-44 + R>44**). Na **tabela 17**, são apresentados os resultados do teste de qui-quadrado e cálculo de OR, para os três polimorfismos estudados. Como observado, há maior frequência do alelo Ex8C (genótipos Ex8CC+CT) no grupo **R<34** ($p=0,044$). Os indivíduos portadores desse alelo têm uma probabilidade 3,1 vezes maior de apresentar redução de LDL-C inferior a 34% (OR=3,07; 95% IC: 1,00 - 9,5).

Tabela 17. Relação entre os polimorfismos *SCARB1* e a resposta de LDL colesterol ao tratamento com atorvastatina, em hipercolesterolêmicos

Variante		Grupo R<34 (49)	R34-44 + R>44 (98)	
G4A	GG	82%(40)	73%(72)	$\chi^2 = 1,200$; 1 gl, P=0,273
	GA+AA	18%(9)	27%(26)	OR=0,62 (95% IC: 0,27 - 1,46)
In5C>T	CC	84%(41)	85%(87)	$\chi^2 = 0,25$; 1 gl, P=0,617
	CT	16%(8)	13%(13)	OR=1,28 (95% IC: 0,49 - 3,32)
Ex8C>T	CC+CT	92%(45)	79%(77)	$\chi^2 = 4,073$; 1 gl, P=0,044
	TT	8%(4)	21%(21)	OR=3,07 (95% IC: 1,00 - 9,5)

Nota: Número de indivíduos em parêntesis; gl, graus de liberdade; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

Adicionalmente, foram comparadas as frequências genóticas de indivíduos com tercil de resposta mais reduzida (**R<34**) com as de indivíduos com tercil de resposta mais acentuada (**R>44**). Confirmou-se a relação entre o polimorfismo Ex8C>T e o grupo **R<34** ($p=0,0049$). Os portadores do alelo Ex8C têm uma chance 5 vezes maior de apresentar redução de LDL-C inferior a 34% do que apresentar redução de LDL-C superior a 44% (OR=4,96; 95% IC: 1,51 - 16,31).

Tabela 18. Distribuição de genótipos do SNP *SCARB1* Ex8C>T nos grupos resposta R≤34 e R>44.

Genótipo <i>SCARB1</i>	R<34 (49)	R>44 (49)	
Ex8C>T			
Ex8CC	92% (45)	69% (34)	$\chi^2 = 7,900; 1gl, P=0,0049$
Ex8CT+TT	8% (4)	31% (15)	OR=4,96 (95% IC: 1,51 - 16,3)

Número de indivíduos em parêntesis; *gl*, graus de liberdade; OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confiança.

4.4. Estudo de haplótipos

Para avaliar o efeito combinado das variantes no gene *SCARB1*, nós realizamos a análise de associação de haplótipos. As combinações de genótipos geradas pelos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T estão representadas nas **tabelas 19** e **20** para os grupos NL e HC, respectivamente. As frequências dos haplótipos *SCARB1* entre HC e NL foram similares ($p>0,05$) (**tabela 21**).

Na **tabela 22**, são mostradas as frequências dos haplótipos para os indivíduos NL e HC, obtidas usando o algoritmo EM no *software* Arlequin 3.11. Dos 8 possíveis haplótipos gerados pela combinação de 3 alelos, 7 foram encontrados. Os códigos G₁, C₅ e C₈ indicam a presença dos alelos 4G, In5C e Ex8C, respectivamente. Enquanto que os códigos A₁, T₅ e T₈ indicam a presença dos alelos 4A, In5T e Ex8T, respectivamente.

Os haplótipos mais freqüentes foram: G₁C₅C₈ (NL:54%, HC:49%) e G₁C₅T₈ (NL:28%, HC:34%), entretanto o haplótipo A₁T₅T₈ foi considerado raro (**tabela 22**).

Tabela 19. Frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C>T em normolipidêmicos

Polimorfismos In5C>T	Ex8C>T			G4A
	CC	CT	TT	
CC	28% (52)	30% (56)	8% (15)	GG
	7% (13)	9% (16)	3,5% (6)	GA
	0% (0)	0,5% (1)	0,5% (1)	AA
CT	5% (9)	1% (2)	0% (0)	GG
	2,5% (5)	3,5% (6)	0,5% (1)	GA
	(0)	0,5% (1)	(0)	AA
TT	0% (0)	0% (0)	0% (0)	GG
	0,5% (1)	0% (0)	0% (0)	GA
	0% (0)	0% (0)	0% (0)	AA

Nota: Número de indivíduos em parêntesis.

Tabela 20. Frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C>T em hipercolesterolêmicos

Polimorfismos		Ex8C>T		
In5C>T	CC	CT	TT	G4A
CC	24,2%(36)	31%(45)	13%(19)	GG
	5%(7)	10%(14)	3%(5)	GA
	0%(0)	0%(0)	0%(0)	AA
CT	5%(7)	3%(5)	0%(0)	GG
	4%(6)	0,6%(1)	0,6%(1)	GA
	0%(0)	0,6%(1)	0%(0)	AA
TT	0%(0)	0%(0)	0%(0)	GG
	0%(0)	0%(0)	0%(0)	GA
	0%(0)	0%(0)	0%(0)	AA

Nota: Número de indivíduos em parêntesis.

Tabela 21. Distribuição de haplótipos *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C>T em hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos

Haplótipos	HC (147)	NL (185)
G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ C ₈	24,2% (36)	28% (52)
G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ T ₈	31% (45)	30% (56)
G ₁ C ₅ T ₈ /G ₁ C ₅ T ₈	13% (19)	8% (15)
G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ C ₈	5% (7)	7% (13)
G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ T ₈	10% (14)	9% (16)
G ₁ C ₅ T ₈ /A ₁ C ₅ T ₈	3% (5)	3,5% (6)
G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ T ₅ C ₈	5%(7)	5%(9)
G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ T ₅ T ₈	3%(5)	1%(2)
G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ T ₅ C ₈	4%(6)	2,5%(5)
G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ T ₅ T ₈	0,6%(1)	3,5%(6)
G ₁ C ₅ T ₈ /A ₁ T ₅ T ₈	0,6%(1)	0,5%(1)
A ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ T ₅ T ₈	0,6%(1)	0,5%(1)
G ₁ T ₅ C ₈ /A ₁ T ₅ C ₈	0%(0)	0,5%(1)
A ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ T ₈	0%(0)	0,5%(1)
A ₁ C ₅ T ₈ /A ₁ C ₅ T ₈	0,6%(1)	0,5%(1)
$\chi^2 = 9,810$, 14gl, P=0,776		

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. gl, graus de liberdade; 1,5,8, apontam alelo para G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos.

Tabela 22. Freqüências haplotípicas para os polimorfismos *SCARB1* em normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.

Haplótipos	NL (185)	HC (147)
G₁C₅C₈	54%	49%
G₁C₅T₈	28%	34%
A₁C₅T₈	6%	5%
A₁C₅C₈	5%	5%
G₁T₅C₈	4%	4%
A₁T₅C₈	2%	2%
A₁T₅T₈	1%	1%

Nota: Freqüências obtidas pelo algoritmo EM no programa Arlequin v 3.11. Subscritos _{1,5,8}, indicam alelo para G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos.

4.4.1. Relação dos haplótipos com perfil lipídico sérico e resposta ao tratamento com atorvastatina

A influência dos haplótipos sobre o perfil lipídico sérico basal e a resposta a atorvastatina (10 mg/dia) em indivíduos hipercolesterolêmicos, estão representadas nas **tabelas 23 e 24**, para os grupos NL e HC respectivamente. Para evitar atribuir de modo incerto indivíduos a um determinado haplótipo, nós não consideramos nessa análise os indivíduos que apresentavam duplo heterozigoto, ou seja, aqueles indivíduos que foram heterozigotos para mais de um dos três polimorfismos estudados. Para facilitar a análise, os portadores dos haplótipos $G_1C_5C_8/G_1C_5T_8$ e $G_1C_5T_8/G_1C_5T_8$ foram reunidos num único grupo, devido a que ambos representam a influência do haplótipo $G_1C_5T_8$.

No grupo NL, os indivíduos portadores dos haplótipos $G_1C_5C_8/G_1C_5T_8$ + $G_1C_5T_8/G_1C_5T_8$ apresentaram valores de TG e VLDL-C maiores que os portadores do haplótipo $G_1C_5C_8/G_1T_5C_8$ ($p=0,008$) (**tabela 23 e Figura 13**). Entretanto, essas diferenças não foram observadas no grupo HC (**tabela 24 e figura 14**). No grupo HC, foi observado que os portadores do haplótipo $G_1C_5C_8/G_1T_5C_8$ apresentaram valores basais de HDL-C e ApoA1 menores quando comparados com os dos portadores dos outros haplótipos ($p=0,049$) (**figura 14**).

Após o tratamento com atorvastatina, quando analisada a variação dos parâmetros do perfil lipídico, pode-se observar diferenças na variação de apoB ($p=0,017$) e na razão apoB/apoA1 ($p<0,001$), sendo que o haplótipo $G_1C_5C_8/A_1C_5C_8$ demonstrou ter uma variação diminuída comparado com os outros haplótipos (**figuras 15 e 16**).

Tabela 23. Relação dos haplótipos *SCARB1*, gerados pelos SNPs G4A, In5C>T e Ex8C>T, com os valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos normolipidêmicos.

Parâmetro	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ T ₈ + G ₁ C ₅ T ₈ /G ₁ C ₅ T ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ T ₅ C ₈	P
N	52	71	13	9	
IMC	27,0±4,8	26,2±4,0	24,0±3,0	26,1±6,0	0,192
CT (mg/dL)	169±19	176±18	170±16	174±16	0,192
LDL-C (mg/dL)	94±18	99±18	102±14	101±20	0,262
HDL-C (mg/dL)	59±14	58±13	54±9	60±10	0,593
VLDL-C (mg/dL)	16±6 ^{a,b}	18±5 ^a	14±5 ^{a,b}	13±3 ^b	0,008**
Triglicérides (mg/dL)	80±30 ^{a,b}	88±25 ^a	71±22 ^{a,b}	63±13 ^b	0,008**
ApoAI	143±28	145±29	131±22	141±21	0,406
ApoB	81±20	85±25	83±13	90±23	0,726
apoB/apoAI	0,60±0,22	0,62±0,24	0,64±0,10	0,66±0,23	0,686

N = número de indivíduos. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA seguido do teste de Tukey para variáveis com distribuição normal (*) e transformadas em log (**) (p<0,05). 1, 5, 8, apontam alelo para G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa (p<0,05).

Tabela 24. Relação dos haplótipos *SCARB1* com os valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia)

Parâmetro	Fase	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ T ₈ + G ₁ C ₅ T ₈ /G ₁ C ₅ T ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ T ₅ C ₈	P
N		36	64	7	7	
IMC (Kg/m ²)	basal	27,7±4,3	28,1±3,8	27,6±1,9	29,9±6,3	0,604
Colesterol Total	basal	275±33	282±36	297±50	263±39	0,294
(mg/dL)	Tratamento	197±30	194±31	220±28	187±32	0,160
	% de variação	-28±10	-31±9	-25±10	-29±5	0,285
LDL-C	basal	184±30	194±32	216±48	184±32	0,090
(mg/dL)	Tratamento	114±25	114±27	140±21	114±24	0,104
	% de variação	-37±14	-41±11	-33±14	-38±7	0,342
HDL-C	basal	59±15 ^a	56±14 ^a	60±10 ^a	45±10 ^b	0,049**
(mg/dL)	Tratamento	57±14	54±12	60±16	46±10	0,074
	% de variação	-3±12	-4±9	-1±10	1±8	0,554
VLDL-C	basal	31±13	32±12	22±7	35±14	0,177
(mg/dL)	Tratamento	25±10	26±10	20±8	27±13	0,483
	% de variação	-15±25	-14±29	-12±20	-21±12	0,911

Tabela 24. continuação

Parâmetro	Fase	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ C ₅ T ₈ + G ₁ C ₅ T ₈ /G ₁ C ₅ T ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /A ₁ C ₅ C ₈	G ₁ C ₅ C ₈ /G ₁ T ₅ C ₈	P
Triglicérides	basal	156±65	159±60	111±33	173±70	0,177
(mg/dL)	Tratamento	126±50	130±51	100±40	136±64	0,483
	% de variação	-15±25	-14±29	-12±20	-21±12	0,911
ApoAI	basal	139±29 ^a	134±26 ^a	143±13 ^a	112±14 ^b	0,049**
(mg/dL)	Tratamento	142±32	136±27	134±22	118±19	0,196
	% de variação	3±11	1±11	-6±10	5±10	0,187
ApoB	basal	137±24	144±23	133±28	146±28	0,306
(mg/dL)	Tratamento	98±22	97±20	106±15	101±25	0,687
	% de variação	-29±11 ^a	-33±12 ^a	-17±19 ^b	-30±9 ^{a,b}	0,017*
apoB/apoAI	Basal	1,04±0,27	1,11±0,26	0,94±0,25	1,29±0,17	0,063
	Tratamento	0,73±0,21	0,74±0,20	0,80±0,15	0,86±0,17	0,407
	% de variação	-30±12 ^a	-33±11 ^a	-10±25 ^b	-34±11 ^a	<0,001*

N= número de indivíduos. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA seguido do teste de Tukey para variáveis com distribuição normal (*) e transformadas em log (**) (p<0,05). Valores negativos (-) de % de variação representam redução. ^{1,5,8}, apontam alelo para G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa (p<0,05).

Figura 13. Perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos de acordo com os haplótipos do *SCARB1*. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B; _{1,5,8}, indicam os alelos dos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

Figura 14. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos hipercolesterolêmicos de acordo com os haplótipos do *SCARB1*. Valores são apresentados como média + DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B; _{1,5,8}, indicam os alelos dos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

Figura 15. Concentrações de apoB de indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia) de acordo com os haplótipos do *SCARB1*. Valores são apresentados como média $\pm$ DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. p10, após tratamento; 1,5,8, indicam os alelos dos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

Figura 16. Razão apoB/apoAI em indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia) de acordo com os haplótipos do *SCARB1*. Valores são apresentados como média $\pm$ DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. p10, após tratamento; 1,5,8, indicam os alelos dos polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

4.4.2. Estudo do desequilíbrio de ligação

O estudo de desequilíbrio de ligação mediante o calculo do coeficiente D' de Lewonstin (Lewontin, 1964) do programa *SNPAnalyzer*, demonstrou que os polimorfismos In5C>T e Ex8C>T do *SCARB1* encontram-se em desequilíbrio de ligação ($D'=0,764$). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os SNPs G4A e In5C>T ($D'=0,337$) e entre os SNPs G4A e Ex8C>T ($D'=0,119$).

Devido a que os polimorfismos In5C>T e Ex8C>T estão em desequilíbrio de ligação também foi realizada a análise de diplótipos utilizando as combinações desses dois polimorfismos.

4.4.3. Relação dos diplótipos com perfil lipídico sérico e resposta ao tratamento com atorvastatina

As frequências dos haplótipos dos polimorfismos In5C>T e Ex8C>T são mostradas na **tabela 25**. Não houve diferenças na distribuição dos haplótipos entre os grupos NL e HC ($p>0,05$).

Tabela 25. Distribuição de haplótipos segundo os genótipos dos polimorfismos In5C>T e Ex8C>T no gene *SCARB1* em indivíduos Hipercolesterolêmicos e Normolipidêmicos.

Diplótipo	HC (147)	NL (185)
C ₈ C ₅ /C ₈ C ₅	29%(43)	35%(65)
C ₈ C ₅ /T ₈ C ₅	40%(59)	39%(73)
T ₈ C ₅ /T ₈ C ₅	16%(24)	12%(22)
C ₈ C ₅ /C ₈ T ₅	9%(13)	8%(14)
C ₈ C ₅ /T ₈ T ₅	5%(7)	5%(9)
C ₈ T ₅ /C ₈ T ₅	0%(0)	0,5%(1)
T ₈ C ₅ /T ₈ T ₅	1%(1)	0,5%(1)

$\chi^2 = 3,031$, 6gl, P=0,805

Número de indivíduos em parêntesis. gl, graus de liberdade; 5, 8, apontam alelo para In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. NL, Normolipidêmicos; HC, Hipercolesterolêmicos

Nas **tabelas 26 e 27**, estão representadas as relações entre os diplótipos dos polimorfismos In5C>T e Ex8C>T e os perfis lipídicos séricos, antes e após o tratamento com atorvastatina. Como explicado na análise anterior, foram considerados apenas os indivíduos que apresentavam um haplótipo inequívoco, não sendo incluídos os portadores de duplo heterozigoto.

Com a finalidade de simplificar a análise, os portadores de diplótipo C₈C₅/C₈T₅ foram agrupados com os de diplótipo C₈T₅/C₈T₅. Da mesma forma, os portadores de diplótipos C₈C₅/T₈C₅ e T₈C₅/T₈C₅ foram agrupados.

No grupo NL, não foi observada relação entre os diplótipos e o IMC ou perfil lipídico sérico (**tabela 26**).

Nos indivíduos HC, os pacientes portadores do diplótipo C₈T₅ apresentaram valores basais elevados da razão apoB/apoAI (P=0,033), quando comparados com os indivíduos com o diplótipo C₈C₅/C₈C₅ (**figura 17**). Após o tratamento com atorvastatina, os portadores de diplótipo C₈C₅/C₈C₅ tiveram menor redução de apoB/apoAI (p=0,016), quando comparados com os demais diplótipos (**tabela 27 e figura 17**).

Tabela 26. Relação de diplótipos In5C>T e Ex8C>T *SCARB1* com valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos normolipidêmicos.

Parâmetro	C ₈ C ₅ /C ₈ C ₅	C ₈ C ₅ /C ₈ T ₅	C ₈ C ₅ /T ₈ C ₅	P
		C ₈ T ₅ /C ₈ T ₅	T ₈ C ₅ /T ₈ C ₅	
N	65	15	95	-
IMC (kg/m ²)	26,4±4,6	25,6±4,7	26,1±4,7	0,802
Colesterol total (mg/dL)	169±18	177±15	174±19	0,115
LDL-C (mg/dL)	95±18	105±18	98±19	0,214
HDL-C (mg/dL)	58±13	56±10	59±12	0,767
VLDL-C (mg/dL)	16±6	15±5	17±5	0,145
Triglicérides (mg/dL)	78±29	77±24	85±26	0,145
ApoAI	140±27	140±19	143±28	0,801
ApoB	81±19	89±23	85±24	0,467
apoB/apoAI	0,61±0,20	0,65±0,23	0,62±0,23	0,799

N= número de indivíduos. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA. 5, 8, apontam alelo para In5C>T e Ex8C>T, respectivamente. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Tabela 27. Relação dos diplótipos In5C>T e Ex8C>T *SCARB1* com valores de IMC e lipídios séricos em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

Parâmetro	Fase	C ₈ C ₅ /C ₈ C ₅	C ₈ C ₅ /C ₈ T ₅ + C ₈ T ₅ /C ₈ T ₅	C ₈ C ₅ /T ₈ C ₅ + T ₈ C ₅ /T ₈ C ₅	P
N		43	13	83	
IMC (Kg/m ²)	basal	27,6±4,1	29,5±5,3	27,8±4,1	0,380
Colesterol Total	basal	279±36	280±42	280±35	0,990
(mg/dL)	Tratamento	201±30	201±32	194±30	0,433
	% de variação	-28±10	-28±4	-30±9	0,264
LDL-C	basal	189±35	199±37	191±31	0,591
(mg/dL)	Tratamento	118±26	125±26	113±27	0,237
	% de variação	-37±14	-41±11	-33±14	0,207
HDL-C	basal	60±14	51±13	56±14	0,124
(mg/dL)	Tratamento	58±14	51±13	54±12	0,136
	% de variação	-3±12	-1±7	-4±10	0,775
VLDL-C	basal	30±13	30±12	33±14	0,420
(mg/dL)	Tratamento	24±10	26±12	27±11	0,401
	% de variação	-15±25	-14±16	-12±32	0,918
Triglicérides	basal	149±63	149±62	163±68	0,420
(mg/dL)	Tratamento	122±49	128±58	134±56	0,401
	% de variação	-15±25	-14±16	-12±32	0,918
ApoAI	basal	140±27	126±27	135±27	0,297
(mg/dL)	Tratamento	141±30	128±24	138±29	0,384
	% de variação	1±11	1±10	3±13	0,781
ApoB	basal	137±24	160±46	142±24	0,061
(mg/dL)	Tratamento	99±21	106±21	96±19	0,239
	% de variação	-27±14	-31±14	-32±11	0,144
apoB/apoAI	Basal	1,03±0,27 ^a	1,26±0,23 ^b	1,09±0,26 ^{a,b}	0,033*
	Tratamento	0,75±0,20	0,84±0,18	0,72±0,20	0,140
	% de variação	-26±17 ^a	-33±13 ^{a,b}	-33±11 ^b	0,016*

N=Número de indivíduos. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA seguido do teste de Tukey (*) (p<0,05). IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa (p<0.05). 5, 8, indicam alelo para In5C>T e Ex8C>T, respectivamente.

Figura 17. Razão apoB/apoAI em indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina, de acordo com os diplótipos Ex8C>T do *SCARB1*. Valores são apresentados como média $\pm$ DP comparada por teste de ANOVA. (*) $p < 0,05$. p10, após tratamento; 8, 5, apontam alelo para Ex8C>T e In5C>T, respectivamente.

4.5. Estudo da expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP

4.5.1. Eficiência e validação dos ensaios de PCR em tempo real

Para o estudo da expressão relativa, é necessário que os ensaios de PCR tenham uma inclinação da curva (*slope*, Ct vs Log[Concentração]) próximo de -3,3, com uma eficiência entre 90 e 110%. Nas **figuras 18A e 18B**, são apresentadas as curvas da eficiência e os valores do slope e percentagem de eficiência para os ensaios de amplificação da *UBC* e *SCARB1*, respectivamente.

Para validar o método do ΔC_t , é preciso comprovar que as diferenças de expressão entre o gene de referência endógena (*UBC*) e o gene alvo (*SCARB1*) sejam constantes. Com essa finalidade foi construída uma curva

comparando as diferenças de Ct entre o gene alvo e o gene endógeno. O *slope* dessa curva deve apresentar variação entre -0,1 e 0,1 (**figura 18C**), indicando que a escolha do *UBC* como referencia endógena é válida.

Figura 18. Curva de eficiência de amplificação do *UBC* (A) e do *SCARBI* (B) e curva de validação do método do Ct comparativo (C). A e B: Eixo y: Valores de Ct para as diferentes diluições; Eixo x: Log para as diluições 50 ng/μl; 25 ng/μl; 12,5 ng/μl e 6,25 ng/μl. de cDNA. Na esquina superior direita são apresentados os valores do *slope* e cálculo da eficiência da reação. C: Eixo y: Valores de ΔCt para as diferentes diluições; Eixo x: Log para as diluições 50 ng/μl; 25 ng/μl; 12,5 ng/μl e 6,25 ng/μl de cDNA; *slope*, inclinação da curva. Valores foram substituídos na equação da reta ($y=ax + b$) para a obtenção do valor da inclinação, *slope*, representado por “a” na equação.

4.5.2. Influência da atorvastatina na expressão do *SCARB1* em CMSP *in vivo*

A análise da expressão gênica do *SCARB1* em CMSP foi realizada em 166 indivíduos normolipidêmicos (NL), e 98 indivíduos hipercolesterolêmicos antes (HCb) e após (HCp10) tratamento com atorvastatina (10mg/dia).

Os valores de expressão gênica, calculados pelo método do ΔCt ($2^{-\Delta Ct}$), são mostrados na **figura 19** para todos os grupos. Não houve diferenças significativas na taxa de expressão de mRNA do *SCARB1* entre os indivíduos NL e HC ($2^{-\Delta Ct}$, NL: $40,6 \times 10^{-4} \pm 27,2 \times 10^{-4}$; HC: $35,8 \times 10^{-4} \pm 25,4 \times 10^{-4}$; $p=0,113$). O teste *t* para amostras pareadas demonstrou que o tratamento com atorvastatina não modificou os valores de expressão de RNAm nos indivíduos HC ($p=0,958$).

Figura 19. Expressão de mRNA *SCARB1* em indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Valores comparados pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum* (NL vs HCbasal) e teste de Wilcoxon (HCbasal vs HCp10). NL, normolipidêmicos (n=166); HCbasal, hipercolesterolêmicos antes do tratamento (n=98); HCp10, hipercolesterolêmicos após o tratamento com atorvastatina; RNAm, RNA mensageiro. Valores de expressão calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo o $\Delta Ct = Ct$ do *SCARB1* – *Ct* do *UBC*.

4.5.3. Influência dos polimorfismos na expressão do *SCARB1*.

As taxas de expressão de RNAm em CMSP dos portadores dos polimorfismos *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C>T estão representadas nas **figuras 20, 21 e 22**, respectivamente.

Os indivíduos NL portadores dos genótipos 4GA e 4AA apresentaram valores menores taxas de expressão de RNAm, comparados com NL com genótipo 4GG (4GG: $43,3 \times 10^{-4} \pm 28,4 \times 10^{-4}$; 4GA+4AA: $33,4 \times 10^{-4} \pm 22,4 \times 10^{-4}$; $p=0,018$) (**figura 20**). Da mesma forma, os portadores do alelo T (genótipos CT e TT) para o SNP In5C>T mostraram taxas de expressão menores que os indivíduos NL portadores do genótipo In5CC (CC: $42,0 \times 10^{-4} \pm 27,3 \times 10^{-4}$; CT+TT: $32,4 \times 10^{-4} \pm 25,3 \times 10^{-4}$; $p=0,022$) (**figura 21**).

No grupo HC, não foram observadas relações entre os polimorfismos *SCARB1* e os valores de RNAm basal ou pós-tratamento com atorvastatina ($p>0,05$) (**figuras 21, 22 e 23**).

Figura 20. Relação do SNP *SCARB1* G4A com expressão de RNAm *SCARB1* em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Valores comparados pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum*. NL, normolipidêmicos; HCbasal, hipercolesterolêmicos antes do tratamento com atorvastatina; HCp10, hipercolesterolêmicos após o tratamento; RNAm, RNA mensageiro. Valores de expressão calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo o $\Delta Ct = Ct$ do *SCARB1* – Ct do *UBC*.. Grupo NL: 120 indivíduos GG e 46 GA+AA; grupo HC: 76 indivíduos GG e 22 GA+AA. (*) $p<0,05$.

Figura 21. Relação do SNP *SCARB1* In5C>T com expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Valores comparados pelo teste *Mann-Whitney Rank Sum*. NL, normolipidêmicos; HCbasal, hipercolesterolêmicos antes do tratamento com atorvastatina; HCp10, hipercolesterolêmicos após o tratamento; RNAm, RNA mensageiro. Valores de expressão calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo o $\Delta Ct = Ct$ do *SCARB1* – Ct do *UBC*. Grupo NL: 142 indivíduos CC e 24 CT+TT; grupo HC: 83 indivíduos CC e 15 CT+TT. *, $p < 0,05$.

Figura 22. Relação do SNP *SCARB1* Ex8C>T com expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Valores comparados por teste de ANOVA. NL, normolipidêmicos; HCbasal, hipercolesterolêmicos antes do tratamento com atorvastatina; HCp10, hipercolesterolêmicos após o tratamento; RNAm, RNA mensageiro. Valores de expressão calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo o $\Delta Ct = Ct$ do *SCARB1* – Ct do *UBC*. Grupo NL: 73 indivíduos CC, 74 CT e 19 TT; grupo HC: 40 indivíduos CC, 44 CT e 14 TT.

A análise de haplótipos revelou que os portadores do haplótipo G₁C₅C₈/G₁T₅C₈ apresentavam valores diminuídos de expressão de RNAm antes ($14,4 \times 10^{-4} \pm 8,6 \times 10^{-4}$; $p=0,022$) e após ($16,4 \times 10^{-4} \pm 12,5 \times 10^{-4}$; $p=0,015$) o tratamento com atorvastatina, quando comparados com indivíduos do tipo selvagem (G₁C₅C₈/G₁C₅C₈ basal: $34,6 \times 10^{-4} \pm 18,1 \times 10^{-4}$; após tratamento: $37,6 \times 10^{-4} \pm 21,5 \times 10^{-4}$)(**figura 23**).

Figura 23. Relação dos haplótipos *SCARB1* com expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP de normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos. Valores comparados por teste de ANOVA. NL, normolipidêmicos; HCbasal, hipercolesterolêmicos antes do tratamento com atorvastatina; HCp10, hipercolesterolêmicos após o tratamento; RNAm, RNA mensageiro. Valores de expressão calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo o $\Delta Ct = Ct$ do *SCARB1* – Ct do *UBC*; *, $p < 0,05$.

4.5.4. Relação da expressão gênica do *SCARB1* com o perfil lipídico

Para avaliar se a taxa de expressão do *SCARB1* relacionado com as diferentes variáveis do perfil lipídico, nós agrupamos os indivíduos NL e HC em três grupos, por tercil de expressão, dependendo da quantificação do RNAm do *SCARB1* no período basal. Os intervalos para os tercís 1 (**NLt1**), 2 (**NLt2**) e 3 (**NLt3**) no grupo NL foram os seguintes: $2^{-\Delta Ct}$, **NLt1**: $6,9 \times 10^{-4} - 24,7 \times 10^{-4}$; **NLt2**: $24,8 \times 10^{-4} - 42,9 \times 10^{-4}$; **NLt3**: $44,1 \times 10^{-4} - 147,7 \times 10^{-4}$. Para o grupo HC, os intervalos são detalhados a seguir: $2^{-\Delta Ct}$, **HCt1**: $4,2 \times 10^{-4} - 22 \times 10^{-4}$; **HCt2**: $22,1 \times 10^{-4} - 35,8 \times 10^{-4}$; **HCt3**: $37,3 \times 10^{-4} - 153 \times 10^{-4}$.

Nas **tabelas 28 e 29** são apresentados os valores médios dos parâmetros do perfil lipídico sérico e as freqüências dos polimorfismos estudados para os indivíduos NL e HC, respectivamente. O tercil com menor expressão (NLt1) está associado com valores aumentados de apoB no grupo NL ($p=0,022$). No mesmo grupo, as variantes alélicas dos polimorfismos G4A e In5C>T foram encontradas mais freqüentemente no tercil com menor expressão de RNAm ($p<0,05$), o que confirma nossos achados anteriores, onde esse polimorfismos estavam relacionados com uma expressão de RNAm do *SCARB1* reduzida (**figuras 20 e 21**).

O estudo da razão apoB/apoA1 demonstrou que o tercil de menor expressão teve valores aumentados quando comparado com o tercil de maior expressão no grupo NL (NLt1: $0,69 \pm 0,22$; NLt3: $0,59 \pm 0,23$; $p=0,037$) e no grupo HC antes e após o tratamento (HCbasal; HCt1: $1,09 \pm 0,23$; HCt3: $0,98 \pm 0,24$; HCp10; HCt1: $0,75 \pm 0,22$; HCt3: $0,64 \pm 0,14$; $p<0,05$). Por outro lado, em resposta ao tratamento com atorvastatina, os indivíduos pertencentes ao tercil

com menor expressão apresentaram um aumento da taxa de expressão de RNAm do *SCARB1* significativamente maior (HCt1: 38 ± 65 %; $p < 0,001$) comparados com os indivíduos que apresentavam valores maiores de expressão gênica basal (HCt2: -2 ± 29 ; HCt3: -8 ± 49).

Tabela 28. Perfil lipídico sérico e frequências dos SNPs G4A, In5C>T e ExC>T de acordo com a expressão de RNAm do *SCARB1* em normolipidêmicos.

Parâmetro	NLt1 (55)	NLt2 (56)	NLt3 (55)	P
CT (mg/dL)	175 $\pm$ 18	170 $\pm$ 20	173 $\pm$ 19	0,328
LDL-C (mg/dL)	101 $\pm$ 18	95 $\pm$ 20	98 $\pm$ 19	0,203
HDL-C (mg/dL)	58 $\pm$ 11	59 $\pm$ 15	58 $\pm$ 12	0,890
VLDL-C (mg/dL)	15 $\pm$ 5	16 $\pm$ 6	18 $\pm$ 5	0,083
Triglicérides (mg/dL)	77 $\pm$ 26	81 $\pm$ 30	88 $\pm$ 27	0,083
ApoAI (mg/dL)	138 $\pm$ 21	141 $\pm$ 27	145 $\pm$ 30	0,404
ApoB (mg/dL)	92 $\pm$ 25 ^a	82 $\pm$ 19 ^b	81 $\pm$ 23 ^b	0,022*
apoB/apoAI	0,69 $\pm$ 0,22 ^a	0,61 $\pm$ 0,19 ^b	0,59 $\pm$ 0,23 ^b	0,037*
G4A (GA+AA/GG)	22/33	14/42	10/45	0,033*
InC>T (CT+TT/CC)	13/42	7/49	4/51	0,045*
ExC>T (CC/CT/TT)	24/24/7	23/25/8	26/25/4	0,813

Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média $\pm$ DP e comparados por one way ANOVA seguidos por teste de Tukey (*) ($p < 0,05$). ^{a,b}, letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa. As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. NLt1, tercil 1; NLt2, tercil 2; NLt3, tercil 3; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

Tabela 29. Perfil lipídico sérico e frequências dos SNPs G4A, In5C>T e ExC>T de acordo com a expressão basal de RNAm do *SCARB1* em hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina.

Parâmetro	Fase	Hct1 (55)	Hct2 (56)	Hct3 (55)	P
Colesterol Total (mg/dL)	basal	273±30	276±37	268±31	0,608
	Tratamento	196±28	196±35	193±29	0,884
	% de variação	-27±11	-29±9	-28±8	0,836
LDL-C (mg/dL)	basal	185±27	188±33	181±27	0,603
	Tratamento	117±28	117±32	111±21	0,570
	% de variação	-36±15	-38±12	-38±10	0,800
HDL-C (mg/dL)	basal	56±14	56±11	59±14	0,523
	Tratamento	53±11	54±10	57±14	0,336
	% de variação	-5±12	-3±12	-4±7	0,710
VLDL-C (mg/dL)	basal	31±11	32±13	28±11	0,389
	Tratamento	26±9	24±9	25±12	0,651
	% de variação	-12±29	-18±28	-7±31	0,178
Triglicérides (mg/dL)	basal	156±56	158±65	140±57	0,389
	Tratamento	131±46	121±44	125±58	0,651
	% de variação	-12±29	-18±28	-7±31	0,178
ApoAI (mg/dL)	basal	135±28	136±18	145±31	0,277
	Tratamento	139±32	138±23	147±31	0,372
	% de variação	3±14	1±11	2±11	0,848
ApoB (mg/dL)	basal	141±22	150±29	138±33	0,158
	Tratamento	96±22	104±23	92±19	0,087
	% de variação	-31±12	-30±13	-32±11	0,765
apoB/apoAI	Basal	1,09±0,23 ^a	1,13±0,27 ^a	0,98±0,24 ^b	0,049*
	Tratamento	0,75±0,22 ^a	0,77±0,19 ^a	0,64±0,14 ^b	0,016*
	% de variação	-32±13	-30±16	-33±10	0,651
Expressão RNAm	% de variação	38±65	-2±29	-8±49	<0,001*
G4A (GA+AA/GG)	-	5/28	10/22	7/26	0,292
InC>T (CT+TT/CC)	-	6/27	6/26	3/30	0,476
ExC>T (CC/CT/TT)	-	12/16/5	16/13/3	12/15/6	0,714

Número de indivíduos em parêntesis. Valores expressos como média ± DP e comparados por one way ANOVA seguidos por teste de Tukey (*) (p<0,05). ^{a,b}, letras diferentes na mesma linha apontam diferencia estatística significativa. As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado. Hct1, tercil 1; Hct2, tercil 2; Hct3, tercil 3; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicérides; apoAI, apolipoproteína AI; apoB, apolipoproteína B.

5. DISCUSSÃO

Polimorfismos no *SCARB1* têm sido associados com variações no perfil lipídico sérico em estudos realizados em diversas populações, principalmente européia e norte-americana. Até o momento, não tem sido descrito se esses polimorfismos estão associados com resposta ao tratamento com estatinas.

No presente trabalho, nós investigamos a relação entre os polimorfismos G4A, In5C>T e Ex8C>T do *SCARB1* e o perfil lipídico sérico basal e após tratamento com atorvastatina. Também foi estudada a influência dessas variantes e da atorvastatina sobre a expressão de RNAm em CMSP.

As freqüências dos polimorfismos *SCARB1* G4A e In5C>T na nossa população apresentam distribuições similares às populações que têm sido alvos principais das pesquisas desenvolvidas (**tabela 10**). Os alelos 4A e In5T apresentaram freqüências (4A: 13%; In5T: 7%) similares às descritas em estudos nas populações européia e norte-americana (4A: 12% a 13%; In5T: 8% a 11%) (Acton *et al.*, 1999; Osgood *et al.*, 2003; McCarthy *et al.*, 2003).

A freqüência do alelo *SCARB1* Ex8T (37%) neste estudo foi similar a encontrada em populações européias (43 a 50%). Entretanto, as freqüências do alelo Ex8T foram diferentes às descritas nas populações norte-americanas (49 a 51%, $\chi^2 = 10,281$, $P=0,006$) (Acton *et al.*, 1999; Le Jossec *et al.*, 2004; McCarthy *et al.*, 2003; Osgood *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2007). Por outro lado, o alelo Ex8T tem menor freqüência nas populações africana (20%) e asiática (28%) (Le Jossec *et al.*, 2004), mas nossos resultados se mostraram

concordantes com esse último grupo ($\chi^2 = 1,575$, $P=0,209$), mas é importante considerar que o número de indivíduos avaliado naquele estudo foi pequeno.

As diferenças entre as frequências reportadas anteriormente e as apresentadas neste trabalho pode ser explicada pela heterogeneidade étnica da nossa população e pelo tamanho da amostra utilizada nos diferentes estudos.

Na nossa população, nós observamos desequilíbrio de ligação entre os SNPs In5C>T e Ex8C>T como já foi visto previamente na população caucasiana (Acton *et al.*, 1999; Osgod *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008).

Neste estudo, não houve diferenças nas frequências dos SNPs *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C>T entre os grupos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos, o que indica que esses polimorfismos não estão associados com a hipercolesterolemia. Também não foi encontrada associação entre os SNPs do *SCARB1* e hipertensão, IMC, no grupo HC.

Coincidentemente com trabalhos prévios em populações européia e norte-americana (Acton *et al.*, 1999; Osgod *et al.*, 2003; LeJossec *et al.*, 2004; Rodríguez-Esparragón *et al.*, 2005), nós encontramos que os haplótipos mais comuns são G₁C₅C₈ (NL=54% e HC=49%) e G₁C₅T₈ (NL=28% e HC=34%). Porém, devido a que o alelo Ex8T apresenta uma frequência estatisticamente menor na nossa população, as frequências dos haplótipos não são coincidentes com as descritas previamente na população norte-americana (Osgod *et al.*, 2003), onde foi observada a frequência de 37% para o haplótipo G₁C₅C₈, e de 42% para G₁C₅T₈. Por outro lado, Rodríguez-Esparragón e colaboradores (2005), apesar de não ter considerado o polimorfismo G4A na análise, informaram frequências de diplótipos similares às nossas (51% e 37%

para C₅C₈ e C₅T₈, respectivamente) em indivíduos com DAC provenientes de Gran Canária, Espanha.

Neste estudo, a variante 4A foi associada com uma concentração basal diminuída da apoAI, apenas nos indivíduos NL. É possível que a influência desse SNP sobre as concentrações de apoAI seja expressa apenas nos indivíduos com valores normais ou elevados desta apolipoproteína, pois os HC têm concentrações diminuídas de apoAI. Não foi observada associação entre o perfil lipídico basal e o SNP G4A em pacientes hipercolesterolêmicos. Resultados semelhantes foram obtidos em indivíduos norte-americanos não-diabéticos participantes do estudo Framingham (Osgood *et al*, 2003). Por outro lado, nessa população a condição de diabético modifica o efeito do SNP G4A sobre as concentrações de lipídios séricos. Indivíduos diabéticos apresentam alterações no perfil lipídico, ainda antes das complicações atribuídas à hiperglicemia, mostrando valores aumentados de VLDL-C e LDL-C, e diminuídos de HDL-C, assim como uma LDL menor e mais densa (Krentz, 2003).

É interessante observar que as diferenças achadas nos indivíduos NL do nosso estudo atingem apenas os valores de apoAI e não de HDL colesterol. Isso pode ser explicado pelo provável aumento na remoção de partículas de apoAI e a presença de outras apolipoproteínas que também compõem a partícula de HDL, como apoAII e apoAIV, que não foram avaliadas neste trabalho. É importante salientar que a apoAI pode refletir de uma melhor forma o número de partículas de HDL que o colesterol associado à HDL, devido a este último sofrer a ação das enzimas CETP e LCAT, que influenciam a transferência de colesterol e TG com partículas de LDL, e VLDL (Sniderman *et*

al., 2006). Este fenômeno pode também estar influenciado pela pequena casuística estudada e precisa ser confirmado por outros estudos.

Acton e colaboradores (1999) mostraram que a variante 4A estava associada a valores maiores de HDL-C e diminuídos de LDL-C e TG, quando comparados os homens portadores desse alelo com os homozigotos 4GG. Por outro lado, Tai e colaboradores (2003), que estudaram indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), informaram que os portadores do alelo 4A apresentavam concentrações maiores de TG e VLDL-C.

Em nosso trabalho, a presença do alelo *SCARB1* In5T (genótipos In5CT + In5TT) foi relacionada com perfil lipídico sérico basal mais aterogênico. No grupo NL, os portadores do alelo In5T apresentaram valores aumentados de LDL-C, enquanto que os indivíduos HC com este alelo tiveram valores de apoB sérica e razão apoB/apoA1 aumentadas, o que é indicativo de que esses pacientes apresentam um maior risco de desenvolvimento de DAC baseado na meta-análise realizada por Thompson e Danesh (2006).

Contrariamente aos resultados obtidos em nosso estudo em relação à influência do SNP In5C>T sobre o perfil lipídico basal, não foi encontrada associação nesses parâmetros nas populações do estudo Framingham (Osgood *et al.*, 2003) e mulheres européias do estudo Amish (Roberts *et al.*, 2007).

Da mesma forma, Acton e colaboradores informaram associação do polimorfismo In5C>T apenas com valores de TG em homens, sendo que os portadores do genótipo In5CT apresentavam valores reduzidos quando comparados com os indivíduos In5CC (Acton *et al.*, 1999). No mesmo estudo, portadores do alelo In5T apresentaram valores aumentados de IMC.

Acton e colaboradores (1999) encontraram resultados similares de acordo com o genótipo do SNP *SCARB1* Ex8C>T aos obtidos em nosso estudo, onde não houve associação entre a variante Ex8C>T e perfil lipídico sérico basal. Da mesma forma, indivíduos provenientes da cidade de Córdoba, Espanha, não apresentaram diferenças dependentes do genótipo Ex8C>T nos valores basais de lipídios (Tanaka *et al.*, 2007).

Embora não tenhamos encontrado relação do SNP Ex8C>T com alterações no perfil lipídico sérico basal, em estudo com mulheres européias jovens foi observado que as portadoras do alelo Ex8T apresentaram HDL-C aumentado (Roberts *et al.*, 2007). Nesse estudo, os indivíduos posteriormente apresentaram uma resposta diferenciada segundo o genótipo Ex8C>T nos valores de TG no período pós-prandial.

Rodríguez-Esparragón e colaboradores, em 2005, descreveram pela primeira vez que o polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T contribuía para o risco de doença cardiovascular na população masculina, ainda que suas análises não revelaram diferenças significativas entre as variantes genéticas estudadas relacionadas com IMC e perfil lipídico.

No estudo Framingham, o alelo Ex8T foi associado com concentrações maiores de HDL-C em homens (Osgood *et al.*, 2003). Para ambos os gêneros foram observadas concentrações reduzidas de LDL-C e aumento no tamanho das partículas de HDL para os portadores do Ex8T.

Quando analisados indivíduos com HF, o polimorfismo ExC>T foi associado com concentrações maiores de colesterol total, LDL-C, VLDL-C e TG, sendo proposto que o SR-BI pode ter grande importância no metabolismo de apolipoproteínas que contêm apoB em humanos (Tai *et al.*, 2003). Da

mesma forma que o receptor de LDL (RLDL), o SR-BI está envolvido na remoção de VLDL e LDL (Trigatti *et al.*, 2003). É necessário lembrar que o SR-BI foi primeiramente identificado como receptor de LDL nativa e modificada (Acton *et al.*, 1994). Considerando o anterior, o SR-BI pode constituir um mecanismo alternativo ao RLDL no catabolismo dessas lipoproteínas, principalmente em indivíduos que apresentam valores muito elevados de colesterol.

É importante levar em consideração que quase a totalidade dos trabalhos que avaliam a relação de variantes do *SCARB1* com alterações no perfil lipídico sérico reportados até hoje estão restritos a uma diversidade populacional reduzida, especificamente à população norte-americana e europeia, com grande colaboração da comunidade científica espanhola neste último grupo.

Nós informamos que os haplótipos $G_1C_5C_8/G_1C_5T_8$ e $G_1C_5T_8/G_1C_5T_8$ estão associados com valores basais mais elevados de TG e VLDL-C no grupo NL. Os indivíduos HC portadores do haplótipo $G_1C_5C_8/G_1T_5C_8$ apresentaram concentrações diminuídas de HDL-C e apoA1, quando comparados com os outros haplótipos.

A análise de haplótipos também foi realizada por outros grupos. Acton e colaboradores (1999) assinalaram que a influência dos haplótipos sobre alguns parâmetros do perfil lipídico sérico basal era específica para o gênero, onde os autores encontraram diferenças na concentração de HDL-C e LDL-C, sendo que os homens portadores do haplótipo $G_1C_5C_8/A_1C_5C_8$ tiveram uma concentração de HDL-C maior que os indivíduos homozigotos para o tipo selvagem ($G_1C_5C_8/G_1C_5C_8$); e as mulheres com os haplótipos $G_1C_5C_8/G_1C_5T_8$ e

G₁C₅T₈/G₁C₅T₈ mostraram concentrações de LDL-C significativamente diminuídas em comparação com o tipo selvagem.

Na população do estudo Framingham não foram observadas diferenças no perfil lipídico de indivíduos não diabéticos quando analisados os haplótipos G4A/In5C>T/Ex8C>T (Osgood *et al.*, 2003). Os autores também fizeram a análise de diplótipos In5C>T/Ex8C>T. Homens e mulheres portadores do diplótipo T8C5 tiveram valores significativamente mais baixos para a concentração de LDL-C e mais altos para tamanho de partículas de HDL, quando comparados com os outros diplótipos, apresentando esses indivíduos um perfil menos aterogênico. Nós também realizamos essa análise e nossos resultados são sugestivos de que os indivíduos portadores do diplótipo C8T5 têm um perfil mais aterogênico quando comparados com os do tipo selvagem, baseado na razão apoB/apoA1.

Tanto os resultados de trabalhos prévios, como os resultados que nós apresentamos, têm-se mostrado discordantes, mas é importante considerar as características das populações estudadas (gênero, presença de doença cardiovascular, etnia e outras) e tamanho da amostra estudada. Nós temos comparado os dados de nosso trabalho, que tem um desenho de casos e controles, tentando esclarecer a participação dos SNPs no *SCARB1* em pacientes HC, com outros trabalhos que têm utilizado casuísticas diferentes, principalmente os estudos que selecionaram indivíduos da população geral aleatoriamente (Acton *et al.*, 1999; Osgood *et al.*, 2003). Outros estudos que considerem estas variáveis se fazem necessários para a confirmação desses resultados.

O mecanismo biológico básico pelo qual os polimorfismos estudados poderiam influenciar as concentrações de lipídios é ainda desconhecido. O SNP In5C>T é intrônico, e não tem efeito conhecido sobre o *splicing* ou regulação do gene. O SNP Ex8C>T é silencioso e não produz alteração na sequência de aminoácidos da proteína. O polimorfismo G4A, particularmente, resulta em uma troca de aminoácidos (Gly por Ser) na sequência da proteína, o qual poderia modificar a atividade do receptor. Baseado no entendimento atual desta variante no éxon 1, é improvável que possa prejudicar a captação de colesterol por causa de que a captação do colesterol reside primariamente no domínio extracelular do receptor e a troca desse SNP está localizada na cauda N-terminal intracelular da proteína. Todos os SNPs parecem não representar uma alteração funcional na proteína codificada pelo *SCARB1*, localizado na região cromossômica 12q24, embora esses SNPs poderiam estar em desequilíbrio de ligação com mutações funcionais no gene *SCARB1* ou alternativamente com outras variantes em loci proximais, já que vários genes envolvidos no metabolismo lipídico estão localizados nessa região.

Uma importante abordagem do nosso trabalho é que nós, pela primeira vez, observamos que o *SCARB1* está envolvido na resposta á atorvastatina. Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2008) informaram recentemente que o SNP G4A no *SCARB1* modifica a resposta ao fenofibrato na população do estudo GOLDN.

Neste estudo, foi observado que a presença do genótipo Ex8TT está associada com maior redução de colesterol total, LDL-C e da razão apoB/apoA1, indicando possível relação da variante Ex8T com melhor resposta

à atorvastatina. Em oposição, os portadores do genótipo Ex8CC mostraram uma resposta diminuída ao tratamento com atorvastatina.

Nós também abordamos a questão da influência dos polimorfismos do *SCARB1* sobre a resposta a atorvastatina classificando os pacientes tratados nos grupos R<34, R34-44 e R>44, de acordo com o tercil de redução de LDL-C. Essa análise mostrou, como esperado, que o polimorfismo Ex8C>T está associado à resposta de LDL-C aumentada, sendo que a probabilidade de resposta superior a 44% é de 3,1 vezes nos portadores do alelo T. Esse resultado é sugestivo de que o polimorfismo Ex8C>T está relacionado com melhor resposta de LDL-C a atorvastatina.

O estudo de haplótipos *SCARB1* mostrou que o haplótipo G₁C₅C₈/A₁C₅C₈ está relacionado com apoB e razão apoB/apoA1 diminuídas em resposta a atorvastatina. Além disso, os diplótipos C₈C₅/T₈C₅ e T₈C₅/T₈C₅ também estão relacionados com resposta melhor à atorvastatina na variação da razão apoB/apoA1.

Não há trabalhos que descrevam a relação de polimorfismos *SCARB1* e resposta do perfil lipídico a intervenções com estatinas. No estudo GOLDN, foi observado que indivíduos da população geral portadores da variante *SCARB1* 4A apresentavam maior redução de TG sérico e aumento de HDL-C sérico após tratamento com fenofibrato (Liu *et al.*, 2008). Em nosso trabalho o SNP G4A não foi associado com variação na resposta a atorvastatina quando analisado individualmente, mas ele mostrou ter influência quando herdado como um haplótipo.

Em estudo com intervenção dietética, Pérez-Martínez e colaboradores demonstraram que a variante G4A foi associada com LDL-C aumentada após

uma dieta rica em gorduras saturadas em indivíduos saudáveis (Pérez-Martinez *et al.*, 2003).

O polimorfismo *SCARB1* Ex8C>T foi relacionado com concentrações reduzidas de TG pós-prandial por um maior período de tempo em resposta a uma sobrecarga alimentar de gordura (60%) (Tanaka *et al.*, 2007).

O mecanismo fisiológico de como o *SCARB1* atua na resposta terapêutica à atorvastatina também está na espera de novos estudos moleculares e fisiológicos para seu esclarecimento. É possível que uma interação entre os SNPs *SCARB1* estudados e outros polimorfismos nos genes próximos possam ter alguma participação nesta resposta diferenciada à atorvastatina.

No presente trabalho não foram detectadas diferenças na expressão basal de RNAm do *SCARB1* em CMSP entre os grupos NL e HC, sugerindo que a hipercolesterolemia não afeta a expressão desse transcrito.

Vários estudos que analisaram expressão da proteína SR-BI em modelos animais concordam em seus resultados, mostrando uma diminuição no desenvolvimento da aterosclerose com uma expressão aumentada de SR-BI (Krieger, 2001). Experimentos com camundongos mostraram que a super-expressão de *SCARB1* no fígado diminui as concentrações plasmáticas de HDL-C, LDL-C e VLDL-C e aumenta a secreção do colesterol na bile. Em contraste, a supressão do *SCARB1* aumenta os valores de HDL-C no plasma e diminui o conteúdo de colesterol na bile (Kozarsky *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Mardones *et al.*, 2001).

É importante situar que a maior parte dos achados nos modelos animais (camundongos e ratos) mostram a participação do SR-BI principalmente no

metabolismo da HDL. Nesses modelos essa é a lipoproteína que principalmente carrega o colesterol (Hofker *et al.*, 1998). Por outro lado, estudos em humanos, onde o colesterol circula principalmente na LDL, têm demonstrado que as propriedades alternativas do SR-BI de captar outras lipoproteínas podem também ter grande importância, principalmente em modelos de doença caracterizadas por níveis elevados de LDL-C, onde o SR-BI pode ter um papel fundamental, por meio do seu papel no TRC indireto.

De forma coincidente com os nossos resultados, quando foi estudada a expressão de RNAm do *SCARB1* em macrófagos não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica entre indivíduos com aterosclerose e controles saudáveis (Svensson *et al.*, 2005). Num estudo que comparou pacientes diabéticos com e sem hipercolesterolemia, não foram encontradas diferenças quando se comparou o nível de expressão do *SCARB1* com um grupo controle de indivíduos saudáveis (Guan *et al.*, 2008).

Neste estudo, o tratamento com atorvastatina (10 mg/dia) não modificou o perfil de expressão do transcrito *SCARB1* nos indivíduos HC. Em outro estudo, foi observado um aumento da expressão do *SCARB1* em macrófagos tratados com pitavastatina de forma dose dependente (1 a 15 μ M) (Han *et al.*, 2004). Em macrófagos, também foi observado que 5 μ M de atorvastatina aumentam a expressão do *SCARB1* em 1,9 vezes (Llaverias *et al.*, 2006). Quando utilizada a sinvastatina (5-10 mg/dia) em indivíduos diabéticos, não foi modificada a expressão do *SCARB1* em CMSP (Guan *et al.*, 2008).

É interessante que no nosso trabalho, a expressão do *SCARB1* em CMSP de indivíduos HC não foi modificada pelo tratamento com atorvastatina, embora essa característica pareça dependente do nível de expressão basal de

RNA_m do *SCARB1*, já que aqueles indivíduos com expressão basal menor (HCt1) tiveram uma percentagem de variação maior da expressão de RNA_m, comparados com os indivíduos pertencentes aos grupos com expressão de RNA_m intermédio e maior. Da mesma forma, tanto nos pacientes HC como nos NL, os indivíduos pertencentes ao grupo com menor expressão basal de RNA_m do *SCARB1* parecem ter um risco aumentado de desenvolver DAC de acordo com a razão apoB/apoA1.

Em nosso trabalho, quando estudada a influência dos polimorfismos sobre a expressão gênica do *SCARB1*, nós observamos que os SNPs G4A e In5C>T estão associados com menor expressão de RNA_m apenas nos indivíduos NL. Embora, quando analisados os haplótipos, os indivíduos HC portadores do haplótipo G₁C₅C₈/G₁T₅C₈ apresentam valores diminuídos quando comparados com os portadores do tipo selvagem.

Variantes foram identificadas na região promotora do *SCARB1* na população chinesa e taiwanesa (Hsu *et al.*, 2003). Uma deleção de 11bp (-140 a -150 relativo ao sítio de início da transcrição) correspondente a um sítio de ligação para a proteína Sp1, um importante fator de transcrição do *SCARB1*; e uma substituição C>T na posição -142. Os autores demonstraram que a deleção diminui significativamente atividade transcricional do gene. É possível que os polimorfismos G4A e In5C>T estejam em desequilíbrio de ligação com a deleção -11bp na nossa população, mas será necessário estudá-la para confirmar ou descartar esta possibilidade. Além disso, algumas outras possibilidades permanecem ainda não exploradas, incluindo mudanças na estrutura e na estabilidade do RNA_m do *SCARB1*.

6. CONCLUSÕES

As frequências alélicas dos polimorfismos *SCARB1* G4A e In5C>T dos indivíduos deste estudo são similares às de populações européias e norte-americanas. Entretanto, a frequência do polimorfismo Ex8C>T é similar a populações européias e diferente das norte americanas, quando analisado o grupo total de indivíduos.

Os polimorfismos *SCARB1* G4A, In5C>T e Ex8C<T não estão relacionados com o fenótipo de hipercolesterolemia.

O polimorfismo do *SCARB1* In5C>T está relacionado com LDL-C aumentada em NL, e LDL-C, apoB e razão apoB/apoAI aumentadas em HC, sugerindo que os portadores dessa variante apresentam um perfil lipídico sérico basal mais aterogênico nos indivíduos HC.

A resposta à atorvastatina é influenciada por polimorfismos e haplótipos em indivíduos HC. A variante Ex8C>T mostrou associação com resposta aumentada de colesterol total, LDL-C, apoB e razão apoB/apoAI e foi associada com probabilidade de 3,1 vezes de ter resposta de LDL-C aumentada à atorvastatina.

Os polimorfismos *SCARB1* G4A e In5C>T e o haplótipo G₁C₅C₈/G₁T₅C₈ estão associados com menor expressão basal de RNAm do *SCARB1* em CMSP.

O tratamento com atorvastatina não modifica a expressão de RNAm do *SCARB1* em CMSP.

Nossos resultados indicam que os polimorfismos no *SCARB1* são marcadores úteis na avaliação dos valores basais do perfil lipídico sérico e de expressão de RNAm do *SCARB1*, assim como de resposta ao tratamento com atorvastatina.

7. BIBLIOGRAFIA¹

ACTON, SL; SCHERER, PE; LODISH, HF; KRIEGER, M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. **J Biol Chem.** v.269, n.33, p.21003-21009, 1994.

ACTON, S; RIGOTTI, A; LANDSCHULZ, KT; XU, S; HOBBS, HH; KRIEGER, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science.** v.271, n.5248, p.518-520, 1996.

ACTON, S; OSGOOD, D; DONOGHUE, M; CORELLA, D; POCOVI, M; CENARRO, A; MOZAS, P; KEILTY, J; SQUAZZO, S; WOOLF, EA; ORDOVAS, JM. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.19, n.7, p.1734-1743, 1999.

ARAZI, SS; GENVIGIR, FD; WILLRICH, MA; HIRATA, MH; DOREA, EL; BERNIK, M; HIRATA, RD. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. **Clin Chim Acta.** v.393, n.2, p.119-24, 2008.

ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS. IV Brazilian guidelines in arterial hypertension. **Arq. Bras. Cardiol.** v.82, suppl. 4, p.7-22, 2004.

BABITT, J; TRIGATTI, B; RIGOTTI, A; SMART, EJ; ANDERSON, RG; XU, S; KRIEGER, M. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. **J Biol Chem.** v.272, n.20, p.13242-13249, 1997.

BERGMAYER, HU; SCHEIBE, P; WAHLFELD, AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clin Chem.** v.24, n.1, p.58-73, 1978.

BONATERRA, G; HILDEBRANDT, W; BODENS, A; SAUER, R; DUGI, K; DEIGNER, H; TURCANU, D; HEINLE, H; DRÖGE, W; METZ, J; KINSCHERF, R. Increased gene expression of scavenger receptors and proinflammatory markers in peripheral blood mononuclear cells of hyperlipidemic males. **J Mol Med.** v.82, n.2, p.181-190, 2006.

BROWN, MS; GOLDSTEIN, JL. Lowering plasma cholesterol by raising ldl receptors. 1981. **Atheroscler Suppl.** v.5, n.3, p.57-9, 2004.

CALVO, D; VEGA, MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel of the CD36/LIMPII gene family. **J Biol Chem.** v.268, n.25, p.18929-18935, 1993.

¹ Bibliografia está de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas

CALVO, D; GOMEZ-CORONADO, D; LASUNCION, MA; VEGA, MA. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.17, n.11, p.2341-2349, 1997

CAO, G; GARCIA, CK; WYNE, KL; SCHULTZ, RA; PARKER, KL; HOBBS, HH. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1: evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. **J Biol Chem.** v.272, n.52, p.33068 – 33076, 1997.

CUCUIANU, M; COCA, M; HÂNCU, N. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis. A mini review. **Rom J Intern Med.** v.45, n.1, p.17-27, 2007.

DAVIDSON, MH; TOTH, PP. High-density lipoprotein metabolism: potential therapeutic targets. **Am J Cardiol.** v.100, n.11 A, p.32-40, 2007.

EXCOFFIER, L; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol Biol Evol.** v.12, n.5, p.921-927, 1995.

EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online.** v.1, p.47-50, 2005.

FERNÁNDEZ-ORTIZ, A; BADIMON, JJ; FALK, E; FUSTER, V; MEYER, B; MAILHAC, A; *et al.* Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. **J Am Coll Cardiol.** v.23, n.7, p.1562-1569, 1994.

FIELDING, C; FIELDING, PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J Lipid Res.** v.36, n.2, p.211-228, 1995.

FOSSATI, P; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin Chem.** v.28, n.10, p.2077-80, 1982.

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.** v.18, n.6, p.499-502, 1972.

GENVIGIR, FD; SOARES, SA; HIRATA, MH; WILLRICH, MA; ARAZI, SS; REBECCHI, IM; OLIVEIRA, R; BERNIK, MML; DOREA, EL; BERTOLAMI, MC; HIRATA, RD. Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. **Clin Chim Acta.** v.389, n.1-2, p.79-86, 2008.

GREAVES, DR; GOUGH, PJ; GORDON, S. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. **Curr Opin Lipidol.** v.9, n.5, p.425-432, 1998.

GUAN, JZ; TAMASAWA, N; MURAKAMI, H; MATSUI, J; TANABE, J; MATSUKI, K; YAMASHITA, M; SUDA, T. HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. **J Atheroscler Thromb.** v.15, n.1, p.20-5, 2008.

GUO, SW; THOMPSON, EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics.** v.48, n.2, p.361-72, 1992.

GUZMAN, EC; HIRATA, MH; QUINTAO, EC; HIRATA, RD. Association of the apolipoprotein B gene polymorphisms with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. **Clin Chem Lab Med.** v.38, n.8, p.731-6, 2000.

HAN, J; PARSONS, M; ZHOU, X; NICHOLSON, AC; GOTTO, AM, JR; HAJJAR, DP. Functional interplay between the macrophage scavenger receptor class B type I and pitavastatin (NK-104). **Circulation.** v.110, n.22, p.3472-9, 2004.

HATZOPOULOS, AK; RIGOTTI, A; ROSENBERG, RD; KRIEGER, M. Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis. **J Lipid Res.** v.39, n.3, p.495-508, 1998.

HOFKER, MH; VAN VLIJMEN, BJ; HAVEKES, LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis.** v.137, n.1, p.1-11, 1998.

HORDER, M; ELSER, RC; GERHARDT, M. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC Methods for Creatine Kinase. **Eur. J. Chem. Clin. Biochem.** v.29, n.2, p.435-56, 1991.

HSU, LA; KO, YL; WU, S; TENG, MS; PENG, TY; CHEN, CF; CHEN, CF; LEE, YS. Association between a novel 11-base pair deletion mutation in the promoter region of the scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL cholesterol levels in Taiwanese Chinese. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.23, n.10, p.1869-74, 2003.

KOSTERS, A; KARPEN, SJ. Bile acid transporters in health and disease. **Xenobiotica.** v.38, n.7-8, p.1043-71, 2008.

KRENTZ, AJ. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab.** v.5, Suppl 1, p.S19-27, 2003.

KRIEGER, M; ACTON, A; ASHKENAS, J; PEARSON, A; PENMAN, M; RESNICK, D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. **J Biol Chem.** v.268, n.7, p.4569-4572, 1993.

KRIEGER, M; HERZ, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). **Annu Rev Biochem.** v.63, p.601-637, 1994.

KRIEGER, M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. **Curr Opin Lipidol.** v.8, n.5, p.275-280, 1997.

KRIEGER, M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic system. **J Clin Invest.** v.108, n.6, p.793-797, 2001.

KOZARSKY, KF; DONAHEE, MH; RIGOTTI, A; IQBAL, SN; EDELMAN, ER; KRIEGER, M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. **Nature.** v.387, n.6631, p.414-7, 1997.

LANDSHULZ, KT; PATHAK, RK; RIGOTTI, A; KRIEGER, M; HOBBS, HH. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. **J Clin Invest.** v.98, n.4, p.984-95, 1996.

LaROSA, JC. Statins and risk of coronary heart disease. **JAMA.** v.283, n.22, p.2935–2936, 2000.

LE JOSSEC, M; WAMBACH, T; LABUDA, D; SINNETT, D; LEVY, E. Genetic diversity patterns in the SR-BI/II locus can be explained by a recent selective sweep. **Mol Biol Evol.** v.21, n.4, p.760-769, 2004.

LENNERNÄS, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. **Clin Pharmacokinet.** v.42, n.13, p.1141-60, 2003.

LEWONTIN, RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics.** v.49, n.1, p.49-67, 1964

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **Am J Clin Nutr.** v.83, n.2, p.456S-460S, 2006.

LIU, Y; ORDOVAS, JM; GAO, G; PROVINCE, M; STRAKA, RJ; TSAI, MY; LAI, CQ; ZHANG, K; BORECKI, I; HIXSON, JE; ALLISON, DB; ARNETT, DK. The SCARB1 gene is associated with lipid response to dietary and pharmacological interventions. **J Hum Genet.** v.53, n.8, p.709-17, 2008.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LLAVERIAS, G; REBOLLO, A; POU, J; VÁZQUEZ-CARRERA, M; SÁNCHEZ, RM; LAGUNA, JC; ALEGRET, M. Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. **Biochem Pharmacol.** v.71, n.5, p.605-14, 2006.

LLORENTE, V; BADIMON, L. Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica. **Rev Esp Cardiol.** v.51, n.8, p.633-41, 1998.

LUIZ, RR; MAGNANINI, MMF. A lógica da determinação do tamanho da amostra em investigações epidemiológicas / The logic of sample size determination in epidemiological research. **Cad. saúde colet.** v.8, n.2, p.9-28, 2000.

MCCARTHY, JJ; LEHNER, T; REEVES, C; MOLITERNO, DJ; NEWBY, LK; ROGERS, WJ; TOPOL, EJ; GENEQUEST INVESTIGATORS. Association of genetic variants in the HDL receptor, SR-B1, with abnormal lipids in women with coronary artery disease. **J Med Genet.** v.40, n.6, p.453-8, 2003.

MALINOWSKI, JM. Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. **American Journal of Health-System Pharmacy.** v.55, n.21, p.2253-2267, 1998.

MANGRAVITE, LM; THORN, CF; KRAUSS, RM. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. **The Pharmacogenomics Journal.** v.6, n.6, p.360-374, 2006.

MANNING-TOBIN, JJ; MOORE, KJ; SEIMON, TA; BELL, SA; SHARUK, M; ALVAREZ-LEITE, JI; DE WINTHER, MP; TABAS, I; FREEMAN, MW. Loss of SR-A and CD36 Activity Reduces Atherosclerotic Lesion Complexity Without Abrogating Foam Cell Formation in Hyperlipidemic Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.29, n.1, p.10-26, 2008.

MARDONES, P; QUIÑONES, V; AMIGO, L; MORENO, M; MIQUEL, JF; SCHWARZ, M; MIETTINEN, HE; TRIGATTI, B; KRIEGER, M; VANPATTEN, S; COHEN, DE; RIGOTTI, A. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. **J Lipid Res.** v.42, n.2, p.170-80, 2001.

MARTINEZ, TL; NASCIMENTO, HM. Special recommendations for lipid-lowering treatment: efficacy and safety. **Arq Bras Cardiol.** v.85, Supl. 5, p.6-8, 2005.

MARTIN, CA; LONGMAN, E; WOODING, C; HOOSDALLY, SJ; ALI, S; AITMAN, TJ; GUTMANN, DA; FREEMONT, PS; BYRNE, B; LINTON, KJ. Cd36, a class B scavenger receptor, functions as a monomer to bind acetylated and oxidized low-density lipoproteins. **Protein Sci.** v.16, n.11, p.2531-41, 2007.

MILIOTI, N; BERMUDEZ-FAJARDO, A; PENICHET, ML; OVIEDO-ORTA, E. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin Dev Immunol.** v.2008, n.723539, p.1-15, 2008.

MURAO, K; TERPSTRA, V; GREEN, SR; KONDRATENKO, N; STEINBERG, D; QUEHENBERGER, O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. **J Biol Chem.** v.272, n.28, p.17551-17557, 1997.

NAUCK, M; MARZ, W; WIELAND, H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. **Clin Chem.** v.44, n.7, p.1443-51, 1998.

ORITA, M; IWAHANA, H; KANAZAWA, H; HAYASHI, K; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.86, n.8, p.2766–2770, 1989.

OSGOOD, D; CORELLA, D; DEMISSIE, S; CUPPLES, LA; WILSON, PWF; MEIGS, JB; SCHAEFER, EJ; COLTELL, O; ORDOVAS, JM. Genetic variation at the scavenger receptor class b type i gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the framingham study. **J Clin Endocrinol Metab**. v.88, n.6, p.2869-2879, 2003.

PEARSON, AM. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr Opin Immunol**. v.8, n.1, p.20-28, 1996.

PÉREZ-MARTÍNEZ, P; ORDOVÁS, JM; LÓPEZ-MIRANDA, J; GÓMEZ, P; MARÍN, C; MORENO, J; FUENTES, F; FERNÁNDEZ DE LA PUEBLA, RA; PÉREZ-JIMÉNEZ, F. Polymorphism exon 1 variant at the locus of the scavenger receptor class B type I gene: influence on plasma LDL cholesterol in healthy subjects during the consumption of diets with different fat contents. **Am J Clin Nutr**. v.77, n.4, p.809-13, 2003.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**. v 29, n.9, p.2002-7, 2001.

PLÜDDEMANN, A; MUKHOPADHYAY, S; GORDON, S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. **Expert Rev Mol Med**. v.8, n.28, p.1-25, 2006.

PLÜDDEMANN, A; NEYEN, C; GORDON, S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. **Methods**. v.43, n.3, p.207-17, 2007.

PUC CETTI, L; ACAMPA, M; AUTERI, A. Pharmacogenetics of statins therapy. **Recent Patents Cardiovasc Drug Discov**. v.2, n.3, p.228-36, 2007.

RIFAI, N; KING, ME. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. **Clin Chem**. v.32, n.6, p.957-61, 1986.

RIGOTTI, A; ACTON, SL; KRIEGER, M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. **J Biol Chem**. v.270, n.27, p.16221-16224, 1995.

RIGOTTI, A. Scavenger Receptors and Atherosclerosis. **Biol. Res**. v.33, n.2, p.97-103, 2000.

RIGOTTI, A; MIETTINEN, H; KRIEGER, M. The role of the high density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. **Endocr Rev**. v.24, n.3, p.357-387, 2003.

ROBERTS, CG; SHEN, H; MITCHELL, BD; DAMCOTT, CM; SHULDINER, AR; RODRIGUEZ, A. Variants in scavenger receptor class B type I gene are associated with HDL cholesterol levels in younger women. **Hum Hered**. v.64, n.2, p.107-13, 2007.

RODRIGUES, AC; HIRATA, MH; HIRATA, RD. The genetic determinants of atorvastatin response. **Curr Opin Mol Ther.** v.9, n.6, p.545-53, 2007

RODRÍGUEZ-ESPARRAGÓN, F; RODRÍGUEZ-PÉREZ, JC, HERNÁNDEZ-TRUJILLO, Y; MACÍAS-REYES, A; MEDINA, A; CABALLERO, A; FERRARIO, CM. Allelic variants of the human scavenger receptor class B type 1 and paraoxonase 1 on coronary heart disease: genotype-phenotype correlations. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.25, n.4, p.854-860, 2005.

SALAZAR, LA; HIRATA, MH; CAVALLI, SA; MACHADO, MO; HIRATA, RDC. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.** v.44, n.8, p.1748-50, 1998.

SALAZAR, LA; HIRATA, MH; QUINTAO, EC; HIRATA, RD. Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. **J Clin Lab Anal.** v.14, n.3, p.125-31, 2000a.

SALAZAR, LA; HIRATA, MH; HIRATA, RDC. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor do LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **RBAC.** v.32, n.3, p.195-199, 2000b.

SAMBROOK, J; RUSSEL, DW. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, cap. 7, 7.9-7.12 e 7.43-7.45, 2001.

SIEDEL, J; *et al.* Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. **Clin. Chem.** v.29, n.6, p.1075-80, 1983.

SNIDERMAN, AD; JUNGNER, I; HOLME, I; AASTVEIT, A; WALLDIUS, G. Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. **J Intern Med.** v.259, n.5, p.455-61, 2006.

SORKIN, SC; FORESTIERO, FJ; HIRATA, MH; GUZMAN, EC; CAVALLI, SA; BERTOLAMI, MC; SALAZAR, LA; HIRATA, RD. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem Lab Med.** v.43, n.12, p.1339-45, 2005.

SPOSITO, AC; Sociedade Brasileira de Cardiologia & *et al.* IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. **Arq Bras Cardiol.** v.88, n.1, p.2-19, 2007.

SVENSSON, PA; ENGLUND, MC; SNACKESTRAND, MS; HAGG, DA; OHLSSON, BG; STEMME, V; MATTSSON-HULTEN, L; THELLE, DS; FAGERBERG, B; WIKLUND, O; CARLSSON, LM; CARLSSON, B. Regulation and splicing of scavenger receptor class B type I in human macrophages and atherosclerotic plaques. **BMC Cardiovasc Disord.** v.5, n.25, p.1-10, 2005.

TAI, ES; ADICONIS, X; ORDOVAS, JM; CARMENA-RAMON, R; REAL, J; CORELLA, D; ASCASO, J; CARMENA, R. Polymorphisms at the SRBI locus are associated with lipoprotein levels in subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Clin Genet.** v.63, n.1, p.53-58, 2003.

TANAKA, T; DELGADO-LISTA, J; LOPEZ-MIRANDA, J; PEREZ-JIMENEZ, F; MARIN, C; PEREZ-MARTINEZ, P; GOMEZ, P; ORDOVAS, JM. Scavenger Receptor Class B Type I (SCARB1) c.1119C>T Polymorphism Affects Postprandial Triglyceride Metabolism in Men. **J Nutr.** v.137, n.3, p.578–582, 2007.

TANCEVSKI, I; RITSCH, A. Comment on 'Effect of atorvastatin on SR-BI expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits' by Zhao et al. (Clin Chim Acta 2006; 365: 119-24). **Clin Chim Acta.** v.373, n.1-2, p.193, 2006.

THOMPSON, A; DANESH, J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. **J Intern Med.** v.259, n.5, p.481-92, 2006.

TODT, JC; HU, B; CURTIS, JL. The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Mertk during apoptotic cell uptake by murine macrophages. **J Leukoc Biol.** v.84, n.2, p.510-8, 2008.

TRIGATTI, B; KRIEGER, M; RIGOTTI, A. Influence of the HDL Receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.23, n.10, p.1732-1738, 2003.

TRIGATTI, B; COVEY, S; RIZVI, A. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. **Biochemical Society Transactions.** v.32, n.1, p.116-20, 2004.

VANDESOMPELE, J; KATLEEN, DP; FILIP, P; POPPE, B; VAN ROY, N; DE PAEPE, A; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology.** v.3, n.7, p.34.1-34.11, 2002.

VAUGHAN, CJ; GOTTO, AM JR. Update on statins: 2003. **Circulation.** v.110, n.7, p.886-92, 2004

WANG, N; ARAI, T; JI, Y; RINNINGER, F; TALL, AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. **J Biol Chem.** v.273, n.49, p.32920-6, 1998.

WEBB, NR; DE VILLIERS, WJ; CONNELL, PM; DE BEER, FC; VAN DER WESTHUYZEN, R. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). **J. Lipid Res.** v.38, n.7, p.1490–1495, 1997.

WEBB, NR; CONNELL, PM; GRAF, GA; SMART, EJ; DE VILLIERS, WJ; DE BEER, FC; VAN DER WESTHUYZEN, DR. SR-BII, an isoform of the scavenger

receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. **J Biol Chem.** v.273, n.24, p.15241-8, 1998.

WÜSTNER, D; MONDAL, M; TABAS, I; MAXFIELD, FR. Direct observation of rapid internalization and intracellular transport of sterol by macrophage foam cells. **Traffic.** v.6, n.5, p.396-412, 2005.

YOO, J; SEO, B; KIM, Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. **Nucleic Acids Res.** v.33, p.W483-8, 2005.

ZHAO, SP; WU, ZH; HONG, SC; YE, HJ; WU, J. Effect of atorvastatin on SR-BI expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. **Clin Chim Acta.** v.365, n.1-2, p.119-24, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A.

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 (LBMA) 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

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

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 200__.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

APÊNCIDE B.

Hospital Universitário e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico
Protocolo Simvastatina / Ezetimibe

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome:.....
Paciente n° Registro
Data do convite:...../...../.....
Data de nascimento:...../...../.....

Sexo: M-1 () F-2 () Menopausa: Pré-1 () Pós-2 ()
Etnia: Branca () Parda () Negra () Amarela ()
Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () há quanto tempo?.....
Fuma () N° de cigarros/dia.....

Consome bebida alcoólica? Sim () Não ()
Até 7 doses/sem. () Mais de 7 doses/sem ()

Possui algum tipo de doença? Sim () Não () Qual(is)?.....

Diabetes Mellitus Sim () Não ()

Já teve Infarte? Sim () Não () Há quanto tempo?.....

É hipertenso? Sim () Não ()

Medida de Pressão arterial:.....(mmHg)

É obeso? Sim () Não ()

Peso (Kg)..... Altura (cm)..... IMC:.....

Toma medicamento? Sim () Não ()

Qual(is)? Em que dosagem?

Profissão:..... Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()

Prática exercício físico? Sim () Não () Com que frequência?.....

Observações

.....
.....
.....
.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente (pai, mãe ou irmãos) com:

Diabetes Mellitus () Quem?.....
Doença cardiovascular () Quem?..... Obesidade () Quem?.....
Hipercolesterolemia () Quem?..... Hipertensão () Quem?.....
Não tem () Não sabe ()

ANEXOS

ANEXO 1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1360/2004

Registro CONEP: 10008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 358/03

Processo nº 25000.041535/2004-01

Projeto de Pesquisa: " *Estudo de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na resposta terapêutica de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com vastinas.* "

Pesquisador Responsável: Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata

Instituição: HU - USP

Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 854/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer. O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.
- b- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 15 de julho de 2004.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 2. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 3. Curriculum lattes

Dados pessoais

Nome Alvaro Danilo Cerda Maureira

Nome em citações bibliográficas CERDA, A.

Sexo Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17
Butantã
05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: () 30913634 Fax: () 38132197

Formação acadêmica/Titulação

- 2007** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas)
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Receptor Scavenger B I: Estudo de polimorfismos e expressão gênica em pacientes hipercolesterolêmicos, *Orientador:* Rosario Dominguez Crespo Hirata.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- 2001 - 2005** Graduação em Licenciatura en Tecnología Médica. Universidad de la Frontera, UFRO, Chile.
Título: Mutacion Gly972Arg en mujeres con ovario poliquístico y controles de la IX region de La Araucania.
Orientador: Luis Antonio Salazar Navarrete.
- 2001 - 2005** Graduação em Tecnología Médica mencion Laboratorio Clínico, hem. Universidad de la Frontera, UFRO, Chile.

Formação complementar

- 2008 - 2008** treinamento de PCR em tempo real. (Carga horária: 32h).
Applied Biosystems do Brasil, Applied, Brasil.
- 2007 - 2007** Farmacogenética Cardiovascular. (Carga horária: 20h).
Universidad de la Frontera, UFRO, Chile.
- 2007 - 2007** Manejo de conflicto y trabajo en equipo. (Carga horária: 16h).
Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile.
- 2006 - 2006** Prevención de Riesgos en la Exposición de Agentes. (Carga horária: 10h).
Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile.
- 2006 - 2006** Garantías Explícitas de Salud G.E.S.. (Carga horária: 10h).
Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile.
- 2006 - 2006** English Language Course. (Carga horária: 200h).
English World Language Center, EW, Chile.
- 2006 - 2006** Reforma de Salud e Internalización del Nuevo Model. (Carga horária: 16h).
Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile.
- 2004 - 2004** Sistemas de Gestión de la Calidad Aplicados al Lab. (Carga horária: 16h).
Universidad de la Frontera, UFRO, Chile.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

- 2008 - 2008** Vínculo: livre, Enquadramento Funcional: monitoria, Carga horária: 6

Atividades

- 02/2008 - 07/2008** Ensino, Farmacia-Bioquímica, Nível: Graduação.
- Disciplinas ministradas
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). FBC0512-Bioquímica Clínica

Hospital Nueva Imperial, HNI, Chile.**Vínculo institucional**

2006 - 2008 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Tecnólogo Médico, Laboratorio Clínico, Carga horária: 44

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Auxiliar Paramédico, Laboratorio Clínico, Carga horária: 44

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Auxiliar paramédico, Laboratorio Clínico, Carga horária: 44

Outras informações Substituição de cargo

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Auxiliar Paramédico, Laboratorio Clínico, Carga horária: 44

Outras informações Substituição de cargo

Atividades

01/2007 - 06/2007 Conselhos, Comissões e Consultoria, Programa de Saúde Intercultural PROMAP, .
Cargo ou função
Assistencia e colaboração na integração da Saúde Intercultural.

Universidad de la Frontera, UFRO, Chile.**Vínculo institucional**

2004 - 2004 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Aluno Ajudante - Banco de Sangue, Carga horária: 2

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Aluno ajudante - Bioquímica Geral, Carga horária: 2

Atividades

10/2004 - 12/2004 Extensão universitária , Direccion General de Extension y Comunicaciones, .
Atividade de extensão realizada
Projeto de Extensão e Comunicações de Acreditação Permanente N 041/2004: Promoción de Salud en Escuela Básica. Satisfacción de una Necesidad y Aporte al Entorno Social.

Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile.**Vínculo institucional**

2003 - 2003 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Campanha "Da Vida Dona Sangre", Carga horária: 2

Áreas de atuação

- 1.** Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: ANÁLISES CLÍNICAS.
- 2.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.
- 3.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
- 4.** Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: ANÁLISES CLÍNICAS / Especialidade: Banco de Sangue.
- 5.** Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: ANÁLISES CLÍNICAS / Especialidade: Hematologia.
- 6.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Espanhol	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 2008** prêmio DOLES ao melhor trabalho na área de bioquímica Clínica no 20º IFCC-WorldLab, 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.
- 2005** Prêmio Universidad de La Frontera. Melhor Aluno Promoção Ano 2005, Universidad de La Frontera.
- 2004** Menção Honrosa. Trabalho científico apresentado no XII Congresso Chileno de Tecnología Médica, Colegio de Tecnólogos Médicos de Chile A.G..

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Valdes, P. ; CERDA, A. ; Barrenechea, C. ; Kehr, M. ; Soto, C. ; Salazar, LA. . No association between common Gly972Arg variant of the insulin receptor substrate-1 and polycystic ovary syndrome in Southern Chilean women. Clinica Chimica Acta, v. 390, p. 63-66, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

1. CERDA, A. ; Arazi, SS. ; Genvigir, FDV. ; Hirata, MH ; Dorea, EL. ; Bernik, MMS ; Hirata, RDC. . Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipids profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals. In: IFCC WorldLab anual meeting, 2008, Fortaleza. Poster Abstracts IFCC WorldLab Fortaleza 2008. Berlin - New York : Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2008. v. 46. p. S571-S572.
2. CERDA, A. ; Barrenechea, C. ; Valdes, P. ; Salazar, LA. . Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX region de La Araucanía. In: XII Congreso Chileno de Tecnología Médica, 2004, Santiago. Libro de resúmenes do XII Congreso Chileno de Tecnología Médica, 2004. p. 29-29.

Apresentações de Trabalho

1. CERDA, A. ; Arazi, SS. ; Genvigir, FDV. ; Hirata, MH ; Dorea, EL. ; Bernik, MMS ; Hirata, RDC. . Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipid profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. CERDA, A. ; Barrenechea, C. ; Salazar, LA. . Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico y controles de la IX Región de La Araucanía. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. Barrenechea, C. ; CERDA, A. ; Salazar, LA. . Mutación Gly972Arg del gen IRS-1 y alteraciones metabólicas en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX región de La Araucanía. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. Barrenechea, C. ; CERDA, A. ; Salazar, LA. . Acidosis Láctica y Diabetes: Una Revisión Actualizada. 2002. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos

1. 20ºIFCC-WorldLab, 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica.Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipids profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals. 2008. (Congresso).
2. XII Congreso Chileno de Tecnología Médica.Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico y controles de la IX Región de La Araucanía. 2004. (Congresso).
3. 1er Congreso Científico de Estudiantes de Tecnología Médica del Sur.Mutación Gly972Arg del gen IRS-1 y alteraciones metabólicas en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX región de La Araucanía. 2004. (Congresso).
4. I Jornada Científica de Estudiantes de Tecnología Médica. Acidosis Láctica y Diabetes: Una Revisión Actualizada. 2002. (Congresso).

ANEXO 4. Prêmio Doles ao melhor trabalho na área de Bioquímica Clínica no IFCC WorldLab. Fortaleza, 2008

endogenous control. Mean level of NPC1L1 mRNA was lower in NL (1.66×10^{-4}) than in baseline hypercholesterolemic groups (HF: 2.88×10^{-4} ; HNF: 2.09×10^{-4} ; $p=0.025$). No differences were found in SREBF1a, SREBF2, SCAP, HMGCR and LDLR mRNA expression between NL, HF and HNF groups ($p>0.05$). Correlation analysis showed no relationship between mRNA expression and serum lipids concentrations before or after therapy. Simvastatin in combination with ezetimibe decreased SREBF1a mRNA expression in HNF individuals (Before: 8.77×10^{-3} ; after: 5.13×10^{-3} , $p=0.009$) but not in HF group (Before: 12.9×10^{-3} ; after: 9.25×10^{-3} ; $p=0.961$). Simvastatin isolated or combined with ezetimibe did not changed mRNA expression levels of SREBF2, SCAP, HMGCR, LDLR and NPC1L1 genes. In conclusion, lipidemic status may regulate NPC1L1 mRNA levels, which role in PBMC remains to be elucidated. Moreover, simvastatin and ezetimibe seems to modulate SREBF1a mRNA expression in non-defective LDLR patients suggesting that functional LDLR plays an important role on intracellular cholesterol homeostasis mediated by SREBP-SCAP signaling pathway.

W202

SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I POLYMORPHISMS AND ITS RELATION WITH SERUM LIPIDS PROFILE AND RESPONSE TO ATORVASTATIN IN BRAZILIAN INDIVIDUALS

Cerda A.¹, Arasi S.S.¹, Genvigir F.D.V.¹, Hirata M.H.¹, Dorea E.L.², Bernik M.M.S.², Hirata R.D.C.¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

²University Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
E-mail: alvarocerda@usp.br

Background. The scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates the selective uptake of the high density lipoprotein (HDL) cholesterol and it participates in the free cholesterol efflux to lipoprotein acceptors. HDL has an important antiatherogenic role associated with its important activity in the cholesterol reverse transport. Polymorphisms in the SR-BI gene (*SCARB1*) were related with variations on plasma lipoprotein profile and other risk factors for cardiovascular disease. Statins are potent inhibitors of the cholesterol synthesis however the response to these therapeutics drugs is highly variable. Several polymorphisms in genes involved in intermediary metabolism of lipids are related to differences in response to lowering-cholesterol medicines. We evaluate whether *SCARB1* polymorphisms influence serum lipid profile and response to atorvastatin in our population.

Methods. *SCARB1* (access number NM_005505) c.726+54C>T at intron 5 (In5C>T) and c.1050C>T at exon 8 (Ex8C>T; rs5888) single nucleotide polymorphisms (SNPs), anthropometric measurements and serum levels of lipids and apolipoproteins were evaluated in 79 hypercholesterolemic (HC) and 173 normolipidemic (NL) unrelated Brazilian subjects. The individuals ranged from 29 to 77 years of age (78 men and 174 women). HC patients were treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks). Venous blood samples after an overnight fast were obtained for genetic analysis and biochemical determinations. We measured serum total cholesterol (TC), HDL cholesterol, triglycerides, apolipoprotein (apo) AI and B. Low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol were calculated using the Friedewald formula. In order to evaluate the muscular and hepatic toxicity of the atorvastatin treatment, we measure creatine kinase (CK) and alanine transaminase (ALT). Genomic DNA was extracted from blood leukocytes using a salting-out method and *SCARB1* polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analysis was performed using the Sigma Stat software version 3.5.

Results. In HC individuals, the frequency of the T alleles for In5C>T and Ex8C>T were 8.0% and 33.0%, respectively. These frequencies were similar to those found in NL individuals (In5T: 6%, and Ex8T: 34%, $p>0.05$) suggesting that these variants were not associated with hypercholesterolemia in our sample population. Moreover, there was no relationship between *SCARB1* SNPs and hypertension, coronary artery disease, obesity in HC individuals ($p>0.05$).

HC individuals carrying the CT+TT genotype at the In5C>T SNP showed higher basal serum concentrations of LDL cholesterol (280 ± 40 mg/dL), apoB (158 ± 47 mg/dL) and reduced apoAI/ApoB ratio (0.87 ± 0.18), than the CC genotype carriers (LDL-C: 179 ± 21 mg/dL; apoB: 138 ± 26 mg/dL; apoAI/ApoB: ratio: 1.09 ± 0.31 ; $p<0.05$). In NL individuals In5 CT+TT genotypes were also associated with increased serum LDL-C ($p=0.037$). There was no association between Ex8C>T genotypes and basal levels of lipids. Atorvastatin reduced significantly total cholesterol, LDL-C, VLDL-C, triglycerides and apoB ($P<0.05$), but it did not influenced HDL-C, apoAI, CK and ALT concentrations in HC

individuals. In5C>T variant was also associated with higher LDL-C after atorvastatin treatment ($p=0.007$). In HC individuals, the Ex8CC genotype was slightly associated with lower serum apoB response to atorvastatin ($p=0.061$). In addition, Ex8CC genotype carriers have lower variation of apoA1/apoB ratio ($45\pm33\%$) in comparison with the Ex8CT ($55\pm27\%$) and Ex8TT ($77\pm27\%$) genotypes carriers ($p=0.017$) in response to atorvastatin.

In5C>T and Ex8C>T SNPs were in linkage disequilibrium ($\chi^2=13.635$, $p=0.009$).

In HC patients, Ex8CC+CT/In5CT+TT haplotype carriers had a more atherogenic profile showing higher baseline serum LDL-C ($p=0.029$) and lower apoA1/apoB ratio ($p=0.021$) compared to those carrying the others haplotypes (Ex8CC/In5CC and Ex8CT+TT/In5CC). After atorvastatin treatment, HC individuals carrying Ex8CC/In5CC haplotype had lower variation on ApoA1/ApoB ratio ($40\pm29\%$) than the Ex8CC+CT/In5CT+TT and Ex8CT+TT/In5CC ($57\pm36\%$ and $60\pm28\%$, respectively) ($p<0.05$). There was no association between the SRBI variants and differences in anthropometric measurements, systolic and diastolic blood pressure or body mass index.

Conclusions. The combination of the Ex8GG genotype and In5CT+TT genotypes at the *SCARB1* confers a more atherogenic serum lipid profile in HC individuals and haplotype Ex8CC/In5CC is associated with lower apoA1/apoB ratio response to atorvastatin in our population.