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

**Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de
*CYP3A4 e CYP3A5 in vitro e in vivo***

Maria Alice Vieira Willrich

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

**São Paulo
2011**

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

Willrich, Maria Alice Vieira
W739ef Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de CY3A4 e
CYP3A5 *in vitro* e *in vivo* / Maria Alice Vieira Willrich. -- São
Paulo, 2011.

138p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Análise clínica : Medicina 2. Farmacogenética 3. Citocromo
I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, orientador.

616.0756-9 CDD

Maria Alice Vieira Willrich

**Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de
CYP3A4 e *CYP3A5* *in vitro* e *in vivo***

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 07 de outubro de 2011.

Não é a força, mas a perseverança que realiza grandes coisas.

Samuel Johnson
(1709-1784), poeta britânico

DEDICATÓRIA

Para minha Família, meu porto seguro.

Verner Willrich (in memoriam)

Teresa Jovita Braga Vieira Willrich

Werner Gustavo Vieira Willrich

AGRADECIMENTOS

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

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, Prof. Dra. Marina Baquerizo Martinez.

À minha orientadora, Prof. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata. Sua capacidade de análise, produção, reflexão, seu espírito de liderança e de equipe são raros. É uma pesquisadora nata, completa, e muito me orgulha ser sua aluna. Obrigada por tantos ensinamentos, não só científicos, mas de vida.

Ao Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, pelo pulso firme, pelas oportunidades que cria, pelas idéias brilhantes que tem. Ele sonha, em seguida planeja, e as ideias tornam-se reais. O senhor é fonte de inspiração para seus alunos.

À Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, que esteve presente em todas as comissões julgadoras do meu trabalho desde o início da minha formação na Universidade de São Paulo, em 2003, com o Mestrado, e muito contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa e meu crescimento intelectual ao longo destes anos.

À Prof. Dra. Primavera Borelli Garcia, que disponibilizou seu laboratório para a visualização de imagens de membranas de *Western Blot* para esta pesquisa.

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

A Mayo Clinic (Rochester, EUA), através da Dra. Linnea M. Baudhuin, co-diretora do *Nucleotide Polymorphism Laboratory* e a toda a sua equipe, pela oportunidade de estágio e grande aprendizado.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, que colocou seu laboratório de pesquisa à disposição para treinamento em cultura celular e *western blot*, o que possibilitou que essas técnicas fossem implantadas em nosso Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida, que possibilitou além da realização da pesquisa em si, a formação do pesquisador com o apoio financeiro à participação em congressos internacionais, estágios no exterior e publicação de artigos.

Às queridas colegas Dra. Alice Cristina Rodrigues e Dra. Fabiana Dalla Vecchia Genvigir, meu profundo agradecimento por terem dividido comigo muitas horas de seus trabalhos com as culturas celulares. Ao Alvaro Danilo Cerda Maureira, que com seu conhecimento avançado em estatística contribuiu muito para este trabalho.

A Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico, que está sempre por perto ajudando em todas as etapas dos trabalhos, por quem tenho um carinho muito grande.

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP. Conviver com vocês durante os anos foi uma experiência de valor inestimável. Aos que já terminaram seus estudos e aos que estão chegando, saibam este tempo deixa saudades. Aproveitem ao máximo todas as oportunidades que tiverem. O trabalho em equipe é bárbaro, e a contribuição de cada um de vocês imensurável. Todos vocês me fizeram crescer, me ajudaram a superar as dificuldades diárias, seja por uma palavra amiga em um momento de frustração, ou simplesmente por estarem presentes. Aprender é um processo diário e contínuo, e eu aprendi com vocês todos os dias.

Aos médicos da Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela obtenção de parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos médicos da Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em especial ao Dr. Egidio Lima Dorea, pela valiosa colaboração na seleção dos pacientes deste estudo.

Aos funcionários da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela generosidade, paciência, pelo espaço que nos deram para a condução da seleção diária dos pacientes.

Aos funcionários do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela realização dos exames de triagem dos pacientes e pelo espaço cedido semanalmente para a coleta de amostras.

Ao Dr. Alvaro Largura, por ter disponibilizado o setor de Toxicologia do Laboratório de Análises Clínicas Alvaro, em Cascavel, PR, para realização dos ensaios de CLAE.

Aos pacientes, que de forma anônima generosamente contribuíram para o melhor entendimento dos fatores que influenciam a resposta terapêutica aos hipolipemiantes.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À minha mãe, Teresa, por acreditar em mim. Obrigada pelo seu incentivo constante para que eu busque meus sonhos.

Ao meu irmão, Werner Gustavo, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar a tomar as decisões difíceis.

A toda a Família Gross, em especial à tia Regina e tio Lotar, por terem me acolhido sempre de forma tão carinhosa.

A Vó Alaíde e a Mãe Ninha, minhas avós queridas que sempre torceram muito por mim.

A Equipe do Laboratório Verner Willrich, em Brusque – SC, pelo apoio incondicional a minha jornada como pesquisadora.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Hipolipemiantes: papel e função	01
1.2 Classes de hipolipemiantes	02
1.3 Estatinas	03
1.3.1 Interações medicamentosas com estatinas	08
1.4 Ezetimiba: inibidor de NPC1L1	08
1.5 Fatores que afetam a biodisponibilidade de fármacos	10
1.6 Citocromo P450 subfamília 3A	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Estudos <i>in vitro</i>	18
3.1.1 Cultivo das células HepG2 e Caco-2	18
3.1.2 Tratamento das células com hipolipemiantes	18
3.1.3 Curva de crescimento e tempo de dobramento celular	20
3.1.4 Efeito de estatinas sobre a viabilidade celular, fragmentação de DNA e ciclo celular	20
3.1.5 Estudo das variantes <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A5*3C</i> e <i>CYP3A5*1D</i>	21
3.1.5.1 Extração e análise do DNA genômico das linhagens celulares	21
3.1.5.2 Sequenciamento de HepG2 e Caco-2 para as variantes estudadas	22
3.1.6 Expressão de RNAm dos genes CYP3A4 e CYP3A5	23
3.1.6.1 Isolamento e avaliação do RNA total	23
3.1.6.2 Expressão gênica em células HepG2 e Caco-2	24
3.1.6.3 Avaliação da eficiência dos iniciadores e sondas	27

	Página
3.1.7	Expressão de proteínas <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> por <i>Western Blotting</i>
3.2	Estudos <i>in vivo</i>
3.2.1	Casuística
3.2.2	Amostras biológicas
3.2.3	Estudo das variantes <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A5*3C</i> e <i>CYP3A5*1D</i>
3.2.3.1	Extração e análise de DNA genômico
3.2.3.2	Genotipagem das variantes <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A5*3C</i> e <i>CYP3A5*1D</i>
3.2.4	Expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células mononucleares
3.2.4.1	Isolamento e avaliação do RNA total
3.2.4.2	Expressão gênica por PCR em Tempo Real Quantitativo (PCRq)
3.2.5	Análise da atividade de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> <i>in vivo</i>
3.2.5.1	Reagentes
3.2.5.2	Dosagem de creatinina urinária
3.2.5.3	Extração líquido-líquido das amostras de urina
3.2.5.4	Condições cromatográficas
3.2.5.5	Otimização do método de CLAE para dosagem de cortisol e 6 β -OH-cortisol
3.3	Análise Estatística
4.	RESULTADOS
4.1	Estudos <i>in vitro</i>
4.1.1	Expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> nas linhagens celulares
4.1.2	Efeito da atorvastatina na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2
4.1.3	Efeito da sinvastatina na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2
4.1.4	Efeito da ezetimiba na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2
4.1.5	Efeito de estatinas na expressão de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> por <i>Western Blotting</i>
4.1.6	Variantes de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> nas linhagens celulares

	Página
4.2	Estudos <i>in vivo</i>
4.2.1	Resposta ao tratamento com atorvastatina
4.2.2	Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de RNAm em CMSP
4.2.3	Efeito de hipolipemiantes sobre a atividade de <i>CYP3A</i>
4.2.4	Haplótipos, resposta farmacológica e expressão gênica
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES
5.1	Estudos <i>in vitro</i>
5.2	Estudos <i>in vivo</i>
6.	REFERÊNCIAS
7.	APÊNDICES
8.	ANEXOS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.	Propriedades farmacocinéticas de sinvastatina e atorvastatina 06
Tabela 2.	Descrição das variantes mais comuns encontradas em <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> 14
Tabela 3.	Iniciadores utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento 23
Tabela 4.	Iniciadores utilizados nas reações de PCR em Tempo Real 26
Tabela 5.	Eficiência do PCRq para os genes estudados 28
Tabela 6.	Anticorpos primários usados nos ensaios de <i>Western Blotting</i> 31
Tabela 7.	Características clínicas e concentrações de lipídeos séricos dos indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos (HC) 56
Tabela 8.	Perfil lipídico e outros parâmetros bioquímicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos HC (n=139), antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas) 57
Tabela 9.	Frequências dos grupos haplotípicos formados pelas variantes <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A5*3C</i> e <i>CYP3A5*1D</i> , em indivíduos NL e HC 64
Tabela 10.	Regressão logística univariada dos haplótipos formados pelas variantes <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A5*3C</i> e <i>CYP3A5*1D</i> com características clínicas dos indivíduos HC e NL 65
Tabela 11.	Análise de regressão linear univariada dos haplótipos dos indivíduos HC com perfil lipídico, expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> e a atividade de <i>CYP3A</i> , antes e após tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas 71

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de farmacocinética de atorvastatina e sinvastatina	05
Figura 2. Metabolismo da sinvastatina mediado pelas CYPs na fase I do metabolismo hepático	06
Figura 3. Estrutura química da ezetimiba	09
Figura 4. Representação da curva-padrão de PCRq para medida de expressão de <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>GAPD</i> e <i>HMBS</i> . A eficiência foi estimada pela análise de regressão linear do gráfico obtido pela relação C_T versus log da concentração de cDNA (ng)	28
Figura 5. Estrutura química do cortisol e seu metabólito 6 β -hidróxicortisol, após oxidação pelo citocromo P450 3A4 e 3A5	38
Figura 6. Cromatograma de uma amostra de urina com os picos de Cortisol (tempo de retenção: 4,115 min) e Dexametasona (tempo de retenção: 6,367 min)	40
Figura 7. Cromatograma de uma amostra de urina com os picos de 6 β hidróxicortisol (tempo de retenção: 2,054 min) e Dexametasona (tempo de retenção: 6,367 min)	40
Figura 8. Perfil basal de expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> nas linhagens HepG2 e Caco-2	44
Figura 9. Efeito da atorvastatina sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células HepG2	45
Figura 10. Efeito da atorvastatina (após 30, 60, 90 e 120 min) na expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> , em células Caco-2	46
Figura 11. Efeito da atorvastatina (após 12 e 24 h) na expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células Caco-2	47

Figura 12.	Efeito da sinvastatina sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células HepG2	48
Figura 13.	Efeito da sinvastatina sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células Caco-2	48
Figura 14.	Efeito do tratamento com ezetimiba e sinvastatina sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células Caco-2	49
Figura 15.	Efeito da ezetimiba sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células Caco-2	50
Figura 16.	Efeito do tratamento com ezetimiba e sinvastatina sobre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em células Caco-2	50
Figura 17.	Efeito das estatinas sobre a expressão de proteína de <i>CYP3A4</i> em HepG2 após 12 e 24 h de tratamento. (A) atorvastatina, (B) sinvastatina	51
Figura 18.	Efeito das estatinas sobre a expressão de proteína de <i>CYP3A5</i> em HepG2 após 12 e 24 h de tratamento. (A) atorvastatina, (B) sinvastatina	52
Figura 19.	Eletroferogramas dos ensaios de sequenciamento de HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F)	53
Figura 20.	Correlação entre a expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina	59
Figura 21.	Perfil de expressão de RNAm basal dos genes estudados em CMSP	60
Figura 22.	Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão de RNAm em CMSP	61
Figura 23.	Avaliação da atividade de CYP3A através da razão 6 β hidróxicortisol/cortisol em amostras de urina	62

Figura 24.	Análise de Desequilíbrio de Ligação entre as variantes estudadas em indivíduos HC e e NL	63
Figura 25.	Efeito dos haplótipos na resposta ao tratamento com atorvastatina 10mg/dia 4 semanas	66
Figura 26.	Efeito dos haplótipos nos valores de CK após tratamento	67
Figura 27.	Efeito dos haplótipos na expressão basal de RNAm de CYP3A4 (A) e CYP3A5 (B) nos indivíduos HC e NL	68
Figura 28.	Efeito dos haplótipos na expressão de RNAm de <i>CYP3A4</i> (A) e <i>CYP3A5</i> (B) nos indivíduos HC após atorvastatina 10mg/dia/4 semanas	69
Figura 29.	Efeito dos haplótipos na atividade de CYP3A nos indivíduos HC após atorvastatina 10mg/dia/4 semanas	70
Figura 30.	Processo hipotético de ativação da transcrição de <i>CYP3A4</i> e <i>CYP3A5</i> , modulado por heterodímeros ativados de PXR-RXR ou CAR-RXR	78

LISTA DE ABREVIATURAS

6βOHc	6- β -hidróxi-cortisol, metabólito ativo do cortisol, excretado na urina
ABC	<i>ATP—binding cassette</i>
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfer Protein</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
C_T	Ciclo <i>Threshold</i>
CYP3A4	Citocromo P450, Subfamília 3A, isoenzima 4
CYP3A5	Citocromo P450, Subfamília 3A, isoenzima 5
DAC	Doença arterial coronariana
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
GAPD	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDL-c	Colesterol da HDL
HMBS	Hidroximetilbilano Sintase
HMG-CoA	3-hidróxi-3metilglutaril Coenzima A
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDL-c	Colesterol da LDL
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
NPC1L1	Transportador Niemann-Pick C1-like 1
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i>
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRq	PCR em tempo real quantitativo
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RT	Transcrição Reversa
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
UGT	UDP-Glicuronil Transferases
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>

WILLRICH, M.A.V. **Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão de CYP3A4 e CYP3A5 *in vitro* e *in vivo*** 2011. 138p. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

Introdução: As CYP3A4 e CYP3A5 são enzimas do citocromo P450 responsáveis pela biotransformação de esteróides endógenos e vários fármacos, entre eles as estatinas. Polimorfismos nos genes *CYP3A4* e *CYP3A5* (*CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*) foram associados com diferenças na resposta hipolipemiante de indivíduos tratados com atorvastatina e sinvastatina. Neste estudo foram avaliados os efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão e a atividade de CYP3A4 e CYP3A5, em linhagens celulares HepG2 e Caco-2 e em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos, e sua relação com variantes de *CYP3A4* e *CYP3A5*. **Métodos:** Foram analisados 99 indivíduos normolipidêmicos (NL) e 139 hipercolesterolêmicos (HC). Os HC foram tratados com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas). A genotipagem das variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* foi feita por PCR-RFLP ou sequenciamento. A análise da expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* foi avaliada por PCR em tempo real quantitativo (PCRq). As proteínas totais de HepG2 foram avaliadas por *Western Blotting*. A atividade de CYP3A4 e CYP3A5 *in vivo* foi avaliada pela relação entre cortisol e seu metabólito, 6 β -hidróxicortisol, na urina (razão 6 β OH-cortisol/cortisol), por CLAE. **Resultados:** O perfil de expressão basal de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* é diferente entre HepG2 e Caco-2. Caco-2 expressa 31 vezes mais *CYP3A4* e 122 vezes mais *CYP3A5* que HepG2. Em células HepG2 tratadas por 12 h, a atorvastatina 20 μ M aumentou a expressão de *CYP3A4* em 10 vezes, em relação ao controle ($p=0,006$). Após 24 h de tratamento, atorvastatina (1-20 μ M) aumentou a expressão de *CYP3A4* em 5 a 8 vezes, nas HepG2 ($p<0,001$). Para *CYP3A5*, a exposição por 12 h à atorvastatina 20 μ M aumentou a expressão em 4 vezes em relação ao controle ($p<0,001$). A exposição à sinvastatina 1,0 μ M por 24 h aumentou a expressão de *CYP3A4*, em 2 vezes ($p<0,01$), em HepG2. Também se observou que, nesse tempo de tratamento, a sinvastatina (0,1 μ M a 10 μ M) aumentou a expressão de *CYP3A5* em 2 a 4 vezes ($p<0,05$). A linhagem HepG2 apresenta alelos funcionais (*CYP3A4*1A* e *CYP3A5*1A*) em homozigose. A linhagem Caco-2 apresenta os alelos não funcionais *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*, em heterozigose. Também foi avaliada a expressão das proteínas *CYP3A4* e *CYP3A5* por *Western Blotting*, em células HepG2, após atorvastatina (0,1 a 20 μ M) e sinvastatina (0,01 a 10 μ M) por 12 e 24 h. O perfil de expressão das proteínas não diferiu com os tratamentos. Nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP), a expressão de RNAm basal de *CYP3A4* é cerca de 2,5 a 9,6 vezes maior que a expressão de *CYP3A5* ($p<0,05$). Observou-se correlação da expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* nessas células, antes ($r^2 = 0,22$; $p<0,0001$) e após o tratamento ($r^2 = 0,58$; $p<0,0001$) com atorvastatina. A expressão basal de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* é maior nos indivíduos (NL) que nos indivíduos (HC) ($p<0,05$). A atorvastatina não influenciou a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP ($p>0,05$). Os indivíduos NL apresentam atividade de *CYP3A4* e *CYP3A5* basal maior que os indivíduos HC- ($p<0,0001$). O tratamento com atorvastatina não alterou a atividade de *CYP3A4* e *CYP3A5* nos HC ($p>0,05$). As variantes gênicas estudadas (*CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*) como grupos haplotípicos não afetaram a resposta ao tratamento, a expressão de RNAm ou a atividade de *CYP3A4* e *CYP3A5*, embora o haplótipo AGT tenha expressão basal de RNAm de *CYP3A5* menor que os portadores de haplótipos GAT e GAC ($p<0,005$). **Conclusão:** Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que a atorvastatina e a sinvastatina, mas não a ezetimiba, influenciam a expressão de CYP3A4 e CYP3A5 *in vitro*, em linhagem derivada de hepatócitos (HepG2), e que este efeito não foi reproduzido em linhagem derivada de enterócitos (Caco-2). A expressão de CYP3A4 e CYP3A5 tem grande variabilidade interindividual, independente do grupo haplotípico de cada indivíduo, e que não é influenciada pela atorvastatina.

Palavras-chave: Estatinas, Ezetimiba, *CYP3A4*, *CYP3A5*, Expressão gênica, Farmacogenômica.

WILLRICH, M.A.V. **Hypolipemiant effects on CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression *in vitro* and *in vivo*** 2011. 138p. Thesis Doctoral [Program of Post-graduation in Pharmacy – Clinical Analyses of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo].

ABSTRACT

Background: *CYP3A4* and *CYP3A5* are enzymes from the cytochrome P450 responsible for the biotransformation of endogenous steroids and several drugs, e.g. statins. Polymorphisms in *CYP3A4* and *CYP3A5* (*CYP3A4**1B, *CYP3A5**3C and *CYP3A5**1D) have been associated with variation of lipid-lowering response in individuals treated with atorvastatin and simvastatin. In this study we evaluated the effect of hypolipemiant on expression and activity of *CYP3A4* and *CYP3A5*, in HepG2 and Caco-2 cell lines as well as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in hypercholesterolemic individuals, and their relationship with *CYP3A4* and *CYP3A5* variants. **Methods:** We analyzed 99 normolipidemic individuals (NL) and 139 hypercholesterolemic (HC). HC subjects were treated with atorvastatin (HC, 10 mg/day/4 weeks). Analysis of *CYP3A4**1B, *CYP3A5**3C e *CYP3A5**1D variants was performed with PCR-RFLP or sequencing assays and mRNA expression of *CYP3A4* and *CYP3A5* with Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed. Total protein content was extracted from HepG2 for *Western Blotting* experiments. Activity of *CYP3A4* and *CYP3A5* *in vivo* was evaluated by 6 β OH-cortisol and cortisol ratio in urine samples, by HPLC-UV method. **Results:** Baseline mRNA expression is different for HepG2 and Caco-2. Caco-2 expresses 31 times more *CYP3A4* and 122 times more *CYP3A5* than HepG2. In HepG2 cells treated for 12h, atorvastatin 20 μ M increased *CYP3A4* expression in 10 times, when compared to the control ($p=0.006$). After 24h treatment, atorvastatin (1-20 μ M) increased *CYP3A4* mRNA expression in 5 to 8 times, in HepG2 ($p<0.001$). To *CYP3A5*, exposure for 12h to atorvastatin 20 μ M increased expression in 4 times when compared to the control ($p<0.001$). Exposure to simvastatin 1.0 μ M for 24 h increased *CYP3A4* expression in 2 times, ($p<0.01$), in HepG2. With the 24h treatment, simvastatin (0.1 μ M - 10 μ M) *CYP3A5* showed increased mRNA expression in 2 to 4 times ($p<0.05$). HepG2 cell line carries homozygous functional alleles (*CYP3A4**1A e *CYP3A5**1A). Caco-2 carries heterozygous *CYP3A5**3C and *CYP3A5**1D. We evaluated the protein expression of *CYP3A4* and *CYP3A5* with Western Blotting in HepG2 cells, after atorvastatin (0.1 - 20 μ M) and simvastatin (0.01 - 10 μ M) for 12 and 24 h. The proteins' profile did not change with statins treatment. In PBMC, baseline mRNA expression of *CYP3A4* is approximately 2.6 to 9.5 times higher than *CYP3A5* ($p<0.05$). There was a correlation in expression between *CYP3A4* and *CYP3A5*, before ($r^2 = 0.22$; $p<0.0001$) and after treatment ($r^2 = 0.58$; $p<0.0001$) with atorvastatin. Baseline mRNA expression of *CYP3A4* and *CYP3A5* is higher in (NL) than in (HC) ($p<0.05$). Atorvastatin treatment did not increase *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA in PBMC ($p>0.05$). *CYP3A4/5* activity was higher in NL subjects than in HC ($p<0.0001$). Atorvastatin treatment did not affect *CYP3A4/5* activity in HC ($p>0.05$). The studied variants *CYP3A4**1B, *CYP3A5**3C e *CYP3A5**1D analyzed as a haplotype block did not affect response to treatment, mRNA expression or activity of *CYP3A4* and *CYP3A5*. However, AGT haplotype showed lower *CYP3A5* mRNA expression levels when compared to GAC and GAT haplotypes at baseline ($p<0.05$). **Conclusion:** The results of this study allow us to conclude that atorvastatin and simvastatin, but not ezetimibe, influence the expression of *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA *in vitro* in HepG2 cell line, but this effect was not reproduced in Caco-2 cell line or PBMC. *CYP3A4* and *CYP3A5* present great interindividual variability, despite the individual's haplotype and is not influenced by atorvastatin.

Keywords: Statins, ezetimibe, *CYP3A4*, *CYP3A5*, Gene expression, Pharmacogenomics.

1. INTRODUÇÃO

“A civilização mata. Desde 1990 mais pessoas morreram de doença arterial coronariana do que de qualquer outra causa”.

Organização Mundial de Saúde, 2011.

1.1 Hipolipemiantes: papel e função

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morte de homens e mulheres em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que 7 milhões de pessoas morram por ano em virtude de DAC. Outros 6 milhões de pessoas morrem anualmente em virtude de derrames. A maioria destas mortes ocorre em países em desenvolvimento, em parte devido ao aumento da longevidade, urbanização e mudança no estilo de vida, com hábitos mais sedentários (OMS, 2011).

A hipercolesterolemia é um fator importante no desenvolvimento da aterosclerose, em particular na DAC (SIMONS, 1986). Vários estudos multicêntricos demonstraram que o colesterol alto está associado com alta taxa de mortalidade (SIMONS, 1986).

Uma revolução no tratamento farmacológico da hipercolesterolemia ocorreu quando da introdução de hipolipemiantes no final da década de 1970, primeiramente com o uso de sequestrantes de ácidos biliares, e em seguida, com a descoberta de um produto natural do caldo fermentado de *Aspergillus terreus*, que depois veio a ser chamado lovastatina (HOU; GOLDBERG, 2009; TOBERT, 2003; ENDO, 1992).

1.2 Classes de hipolipemiantes

Atualmente existem várias classes de hipolipemiantes usados no tratamento da hipercolesterolemia. Estes fármacos podem ser usados em monoterapia ou em terapia combinada. São eles:

- **Sequestrantes de ácidos biliares:** ácidos biliares são derivados do colesterol necessários para a digestão e absorção do colesterol, gorduras e vitaminas lipossolúveis. Quando não disponíveis (sequestrados pelo fármaco), o colesterol é dirigido à síntese de ácidos biliares, e a HMG-coA redutase e os receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) são modulados, diminuindo a concentração plasmática de colesterol (BAYS; STEIN, 2003).
- **Fitosteróis:** o β -sitosterol é o fitosterol mais comum nos vegetais. Os fitosteróis interferem competitivamente com o colesterol intestinal na formação de micelas e, portanto, diminuem a absorção de colesterol (BAYS; STEIN, 2003).
- **Ácido nicotínico:** a niacina é uma vitamina B que tem demonstrado efeitos favoráveis sobre as lipoproteínas. Ela reduz o colesterol da LDL e também os triglicérides (GUYTON, 2010).
- **Fibratos:** os fibratos reduzem a produção de triglicérides e aumento do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL) ao ativar o PPAR- α (*peroxisome proliferator activated receptor alpha*) (BAYS; STEIN, 2003).
- **Ezetimiba:** agentes que bloqueiam a absorção do colesterol da dieta.
- **Estatinas:** agentes que bloqueiam a síntese do colesterol hepático.

As estatinas e a ezetimiba são as classes de fármacos mais utilizadas e serão discutidas em detalhe nas próximas seções.

1.3 Estatinas

As estatinas são inibidores da hidroximetilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima-chave da síntese de colesterol (SHITARA, SUGIYAMA, 2006). A inibição da HMG-CoA redutase interfere não só com a síntese de colesterol, mas também na redução da produção de intermediários isoprenóides, ao impedir a conversão da HMG-coA a ácido L-mevalônico (WANG; LIU; LIAO, 2008). Estes intermediários constituem cerca de 2% das proteínas celulares e controlam diversas funções relacionadas a imunomodulação, neuroproteção e senescência celular (WANG; LIU; LIAO, 2008). Estes efeitos secundários promovem ação anti-inflamatória e antiproliferativa caracterizando os efeitos pleiotrópicos atribuídos às estatinas (MIHOS; SALAS; SANTANA, 2010).

Atualmente existem no mercado sete (7) diferentes estatinas, com diferentes perfis farmacocinético e farmacodinâmico: a sinvastatina, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e pitavastatina.

As estatinas estão associadas com redução no risco relativo de infarto do miocárdio e/ou morte por doença arterial coronariana (DAC) de 23 a 37%, demonstrado em estudos de prevenção primária (WOSCOPS e AFSCAPS/TexCAPS) e prevenção secundária (4S, CARE e LIPID) (SCHMITZ; DROBNIK, 2003).

Recente meta-análise publicada por Mills e colaboradores (2011) incluiu 76 estudos clínicos randomizados para avaliar a eficácia e seguranças das estatinas. Os autores relataram que a terapia com estatinas diminuiu os principais eventos cardiovasculares e consequentemente, a mortalidade nos mais de 170 mil indivíduos avaliados (MILLS *et al.*, 2011).

A sinvastatina é administrada via oral como um pró-fármaco lipofílico em sua forma lactona, inativa (NEUVONEN; BACKMAN; NIEMI, 2008), enquanto a atorvastatina é administrada como sal cálcico na forma ativa hidroxí-ácida (VAUGHAN; GOTTO JÚNIOR, 2004). Ambas são metabolizadas tanto no intestino como no fígado por oxidação, lactonização e glucuronidação, e seus metabólitos são eliminados por secreção biliar ou diretamente da corrente sanguínea para o intestino (NEUVONEN; BACKMAN; NIEMI, 2008).

Na **Figura 1**, é ilustrada a farmacocinética da atorvastatina e sinvastatina. A atorvastatina e a sinvastatina são biotransformadas pelas CYP3A4 e CYP3A5 no intestino e no fígado. A CYP2C8 participa somente do metabolismo da sinvastatina, convertendo a forma ácida de sinvastatina a seus metabólitos (**Figura 2**). (MANGRAVITE; THORN; KRAUSS, 2006). A especificidade bioquímica de CYP3A4 e CYP3A5 pelos seus substratos é tão semelhante que são dificilmente distinguidas (WILKINSON, 2005).

Na fase II da biotransformação hepática, a atorvastatina e a sinvastatina sofrem glucoronidação, mediada pelas UDP-glicuronil transferases (UGT) 1A1 e 1A3, resultando em intermediários acil-glucoronídeos (JACOBSEN *et al.*, 2000; PRUEKSARITANONT *et al.*, 2002). Ao contrário dos ratos, onde as UGTs afetam significativamente a depuração das estatinas, em humanos elas tem pouca influência sobre a depuração total dos fármacos em relação à contribuição das CYP3A4 e CYP3A5 e glicoproteína P (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006).

O efluxo celular da atorvastatina e sinvastatina é realizado pelos transportadores de fase III, representados principalmente pela glicoproteína P, uma proteína da família *ATP-binding cassette* (ABC) (BOGMAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005). A pravastatina, rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina também são substratos de alta afinidade dos transportadores de captação da família dos *solute-carriers* (SLC), tais como SLCO1B1 e SLCO2B1 (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006; GRUBE *et al.*, 2006). Estes transportadores estão envolvidos na captação hepática e intestinal e facilitam a translocação do fármaco para dentro da célula.

A biodisponibilidade oral da sinvastatina é baixa (inferior a 5%), resultante de um extenso metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado. Seu tempo de meia-vida é curto (**Tabela 1**) e por isso, toma-la à noite torna o tratamento mais eficiente, uma vez que a síntese de esteróides é mais ativa durante a noite (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006). A interação entre CYP3A e glicoproteína P no intestino contribui para a extração pré-sistêmica da sinvastatina (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006). O metabolismo pré-sistêmico é menos relevante para a atorvastatina que para a sinvastatina.

Figura 1. Diagrama da farmacocinética da atorvastatina e sinvastatina. Adaptado de Klein *et al.*, 2001. Disponível online em www.pharmgkb.org, e reproduzido com permissão da PharmGKB e Universidade de Stanford.

Nota: O diagrama retrata uma visão generalizada da farmacocinética das estatinas, representando um conjunto de genes que influenciam o transporte e metabolismo desta classe de fármacos. As estatinas são administradas por via oral e entram na circulação sistêmica através dos enterócitos por transporte ativo e passivo via transportadores das famílias de genes ABC e SLC. Os principais órgãos de metabolismo e eliminação das estatinas incluem o fígado e, em menor grau, os rins. O metabolismo é catalizado pelas enzimas da família de genes CYP e UGT. A principal via de eliminação é através da excreção biliar mediada pelos transportadores ABC. A farmacocinética de cada estatina individualmente é influenciada por sua hidrofobicidade. Os compostos mais hidrofílicos, como a pravastatina, requerem transporte ativo para o fígado, são menos metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), e tem maior excreção renal, enquanto os compostos menos hidrofílicos são transportados por difusão passiva e melhores substratos tanto para as CYPs como para os transportadores envolvidos na excreção biliar.

Figura 2. Metabolismo da sinvastatina mediado pelas CYPs na fase I do metabolismo hepático.

Nota: A forma ativa da sinvastatina é metabolizada por CYP3A4, CYP3A5, e CYP2C8. A forma lactona, inativa, é metabolizada somente pelas CYP3A4 e CYP3A5. Adaptado de NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006.

A atorvastatina é altamente solúvel e permeável, sendo completamente absorvida após administração via oral. Sua biodisponibilidade oral é 12%, pois a atorvastatina está sujeita ao metabolismo de primeira passagem tanto na parede do intestino assim como no fígado (LENNERNÄS, 2003).

Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas de sinvastatina e atorvastatina.

Propriedades Farmacocinéticas	Sinvastatina	Atorvastatina
Estrutura Química
Pró-fármaco lactona	Sim	Não
Lipofilicidade da forma lactona ou forma ácida	++++	+++
Absorção (%)	60-85	30
Biodisponibilidade (%)	< 5	12
Extração hepática (%)	≥ 80	70
Ligação a proteínas (%)	> 95	> 98
Meia-vida (h)	2-5	7-20

Metabolismo	CYP3A4/CYP3A5, CYP2C8	CYP3A4/CYP3A5
Substrato OATP1B1	+	+
Substrato BCRP	Não se sabe	+
Substrato MDR1	+, forma ácida	+
Inibidor CYP3A4	+	+
Inibidor CYP2C9	-	-
Inibidor MDR1	+	+
Inibidor BCRP	+	+

Nota: *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP), *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), *Multidrug Resistance Protein 1* (Glicoproteína P) MDR1. Adaptado de NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006.

Aproximadamente de 1 a 5% dos pacientes que utilizam estes fármacos apresentam reações adversas (RA) comuns como mialgia, fraqueza, náusea, diarreia ou constipação (SIRTORI *et al.*, 2011; GILLET; NORRELL; 2011). A frequência das RA é dose-dependente. Embora raras, as RA podem ser graves: dano muscular (fraqueza, fibromialgia, miopatia ou rabdomiólise) e hepatotoxicidade. Como o número de pacientes em tratamento com estatinas no mundo é bastante alto (estima-se que ao final deste ano, 46 milhões de pessoas estarão sob tratamento com estatinas (<http://www.meps.ahrq.gov>) (MEPS, 2005), as ocorrências de RA são consideradas sérias o suficiente para preocupar os órgãos públicos de saúde (SIRTORI *et al.*, 2011).

A resposta farmacológica ao tratamento com estatinas é monitorada principalmente pela redução nos valores séricos de colesterol total e de colesterol da LDL (LDL-c). As estatinas são consideradas seguras, entretanto, aproximadamente um terço dos pacientes tratados com estatinas não atingem os valores de perfil lipídico desejável, como por exemplo, o LDL-c alvo, determinado pelo número de fatores de risco que o indivíduo apresenta (MANGRAVITE; THORN; KRAUSS, 2006). Isto é, estes pacientes não respondem de forma adequada ao tratamento com estatinas. Isto deve em parte às diretrizes para controle da hipercolesterolemia cada vez mais agressivas. Em 2004, o *National Cholesterol Education Program* (NCEP) *Adult Treatment Panel* (ATP) III (GRUNDY *et al.*, 2004) impôs um desafio aos pacientes de alto risco para doença arterial coronariana (DAC) ao recomendar o LDL-c alvo inferior a 70 mg/dL. Doses maiores de estatinas podem ser necessárias para atingir o LDL-c

alvo, ou ainda, uma terapia combinada com outros agentes hipolipemiantes, como o uso concomitante de sinvastatina e ezetimiba.

1.3.1 Interações medicamentosas com estatinas

O uso concomitante com itraconazol, gemfibrozil, niacina, ciclosporina, digoxina, warfarina e eritromicina foi associado com biodisponibilidade oral e parâmetros farmacocinéticos das estatinas elevados (CORSINI, 2003), o que aumenta potencialmente a exposição sistêmica a RA. Ativadores da CYP3A, como corticosteróides e anticonvulsivantes, reduzem significativamente as concentrações plasmáticas das estatinas. Consequentemente, a interação entre esses medicamentos reduz drasticamente a eficácia das estatinas (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004). Isso ocorre porque estes fármacos são metabolizados pelas mesmas vias, como a CYP3A4 e CYP3A5 (NEUVONEN, 2010).

1.4 Ezetimiba: inibidor de NPC1L1

A ezetimiba é um fármaco que tem sido usado em monoterapia ou em combinação no tratamento com estatinas, a fim de potencializar a redução da colesterolemia.

O mecanismo de ação da ezetimiba é complementar ao das estatinas, que inibem a síntese hepática de colesterol. A ezetimiba bloqueia a absorção de colesterol e de fitoesterol provenientes da dieta, por inibição do transportador *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) (SUDHOP *et al.*, 2002; DAVIS JUNIOR; ALTMANN, 2009) nos enterócitos. Esse bloqueio não afeta a absorção de triglicérides, ácidos graxos, ácidos biliares ou vitaminas lipossolúveis (KOSOGLOU *et al.*, 2005; DAVIS; VELTRI, 2007). Além disso, a ezetimiba também pode interagir com o NPC1L1 hepático, modificando a concentração de colesterol biliar e podendo, portanto, alterar a quantidade de colesterol circulante (TEMEL *et al.*, 2007). Em modelos animais, a inibição da absorção do colesterol intestinal pela ezetimiba resulta em redução do colesterol dos quilomícrons, com conseqüente diminuição do colesterol entregue pelos quilomícrons

para o fígado (van HEER; COMPTON; DAVIS, 2001). Esta redução resulta em um aumento compensatório de receptores de LDL hepático, aumentando a captação de LDL e reduzindo a concentração de LDL-c plasmático (REPA *et al.*, 2005).

A ezetimiba (**Figura 3**) não é metabolizada pelas enzimas hepáticas do citocromo P450 (HOWARD, 2011). A ezetimiba passa somente pela Fase II do metabolismo hepático para formar um conjugado fenólico glucuronidado, reação que é mediada pelas enzimas UGT1A1, UGT1A3 e UGT2B15 (KOSOGLOU *et al.*, 2005). A ezetimiba administrada via oral está sujeita a um extenso metabolismo pré-sistêmico na mucosa intestinal para formar o derivado ezetimiba glucuronidada, que é a forma ativa. O pró-fármaco e seu conjugado são transportados através da veia porta para o fígado, onde a ezetimiba sofrerá maior glucuronidação e subsequente secreção biliar para o intestino. Aproximadamente 69% da ezetimiba ingerida é excretada nas fezes. Menos de 1% do fármaco é excretado na urina (KOSOGLOU *et al.*; 2005). A biodisponibilidade da ezetimiba ainda não foi determinada porque o composto é virtualmente insolúvel em meio aquoso adequado para injeção intravenosa (DAVIS JUNIOR; ALTMANN, 2009).

Figura 3. Estrutura química da ezetimiba. Adaptado de KOSOGLOU *et al.*, 2005.

A ezetimiba é considerada um fármaco seguro e bem-tolerado (PANDOR *et al.*, 2009; KATRAGADDA; RAI; ARORA, 2010). Utilizado em monoterapia, ele promoveu uma

redução do colesterol total e do LDL-c de 13,5% e 18,6%, respectivamente (PANDOR *et al.*, 2009).

Quando a ezetimiba é utilizada em associação com a sinvastatina, os indivíduos atingiram concentrações de LDL-c alvo mais facilmente, e reduções da ordem de 60% do LDL-c, quando comparados aos que os que estavam em uso de sinvastatina isolada, portanto a ezetimiba promove um efeito adicional na redução do LDL-c importante como adjuvante no tratamento com estatinas (KATRAGADDA; RAI; ARORA, 2010).

1.5 Fatores que afetam a biodisponibilidade de fármacos

Fatores que modificam a biodisponibilidade de fármacos podem afetar de forma significativa a resposta farmacológica, por alteração da concentração plasmática ou da eficácia do composto farmacologicamente ativo (HOFFMAN *et al.*, 2001; EVANS, MCLEOD, 2003).

Além dos fatores que determinam a resposta farmacológica (absorção, distribuição, metabolização e eliminação), há outros igualmente importantes, tais como o estado de saúde geral do paciente, a gravidade da doença, a idade, o gênero, a dieta, o tabagismo, a atividade física, os hormônios, a qualidade da prescrição farmacológica e a diversidade genética entre os indivíduos (SANDER, 2000; MANGRAVITE; THORN; KRAUSS, 2006).

Estudos realizados no Brasil e em outros países demonstraram que polimorfismos de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico estão associados a diferenças na resposta farmacológica a estatinas. Entre essas proteínas, pode-se citar: receptor de LDL, apolipoproteína (apo) AI, Apo B, Apo E, proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), fatores de transcrição como os *sterol regulatory element binding protein factors* (SREBPF) 1a e 1b, e enzimas como a lipase hepática e a SREBPF *cleavage activating protein* (SCAP) (SALAZAR *et al.*, 2000a; GUZMÁN *et al.*, 2000; GARCÍA-OTÍN *et al.*, 2002; VOHL *et al.*, 2002; SORKIN *et al.*, 2005; FIEGENBAUM *et al.*, 2005a, FIEGENBAUM *et al.*, 2005b).

Além disso, a partir de 2007 muitos estudos de *Genome Wide Association Studies* (GWAS) tem sido publicados (DALY, 2010). A finalidade do GWAS é identificar *loci* que afetam a resposta farmacológica ou a susceptibilidade a RA, ao investigar um grande número de SNPs em milhares de genes. Até então, GWAS de estatinas identificaram *loci* associados com concentrações lipídicas e de lipoproteínas, incluindo vários cuja relação com o metabolismo de lipoproteínas era desconhecida (BARBER *et al.*, 2010). Iakoubova e colaboradores (2008) encontraram um polimorfismo, Trp719Arg, no gene *kinesin family member 6 (KIF6)*, localizado no cromossomo 6, cuja proteína é membro de uma família de motores moleculares envolvidos no transporte intracelular de proteínas complexas, organelas de membrana e RNAm nos microtúbulos (IAKOUBOVA *et al.*, 2008). Entre os 4.519 participantes do estudo, os portadores do alelo 719Arg tiveram redução de eventos coronarianos e melhor resposta o tratamento com pravastatina (IAKOUBOVA *et al.*, 2008). Além disso, uma variante em outro gene, que codifica a calmina (gene CLMN, rs8014194, íntron 1), cuja função ainda é desconhecida, foi associada com reduções 3% menores no colesterol total que os não-portadores da variante (BARBER *et al.*, 2010).

Polimorfismos dos genes das *CYP3A4* e *CYP3A5* (fase I) e de fase III (*ABCB1*) também são variantes importantes na resposta às estatinas, como evidenciaram alguns estudos (KIVISTO *et al.*, 2004; BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004; KAJINAMI *et al.*, 2004; FIEGENBAUM *et al.*, 2005c, ARAZI *et al.*, 2008, GENVIGIR *et al.*, 2008; WILLRICH *et al.*, 2008; REBECCHI *et al.*, 2009). A grande variabilidade interindividual na expressão de enzimas da subfamília CYP3A (20 a 40 vezes) é um fator importante que estimula sua investigação farmacogenética (LAMBA *et al.*, 2010).

1.6 Citocromo P450 subfamília 3A

As duas principais enzimas da subfamília 3A do citocromo P450, *CYP3A4* e *CYP3A5*, têm a capacidade de metabolizar uma variedade de esteróides endógenos e compostos químicos de quase todas as classes farmacológicas, por reações de

hidroxilação, oxidação e redução. Juntas, são responsáveis pelo metabolismo de 37% dos 200 fármacos mais utilizados no mercado americano atualmente (ZANGER *et al.*, 2008).

As CYP3A4 e CYP3A5 são abundantes tanto no epitélio intestinal quanto no fígado, no qual representam 50% de atividade total das enzimas do citocromo P450 (KUEHL *et al.*, 2001). As CYP3A4 e CYP3A5 são codificadas pelos genes *CYP3A4* e *CYP3A5*, que pertencem ao agrupamento *CYP3A43–CYP3A4–CYP3AP2–CYP3A7–CYP3A5P1–CYP3A5*, localizado no cromossomo 7 (7q21-q22.1). Nesse agrupamento, também estão localizados os genes que codificam os outros membros da subfamília CYP3A: CYP3A7 e CYP3A43 (XIE *et al.*, 2004).

A CYP3A7 é a principal forma fetal e sua expressão parece ser silenciada logo após o nascimento, sendo substituída progressivamente pela *CYP3A4* (LACROIX *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 2002). No entanto, a *CYP3A7* está presente em alguns adultos em baixas quantidades no fígado (KUEHL *et al.*, 2001). A *CYP3A43* é uma isoforma cuja função ainda não foi completamente elucidada, mas seu envolvimento no metabolismo de fármacos parece ser de pouca importância, a julgar pela baixa expressão de seu RNAm nos diferentes tecidos (DOMANSKI *et al.*, 2001; GELLNER *et al.*, 2001; BUSI; CRESTEIL, 2005).

Os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* têm 13 éxons e codificam uma proteína de 503 e 502 resíduos de aminoácidos, respectivamente (ambas tem aproximadamente 50 a 57 KDa). A sequência da *CYP3A5* tem 85% de similaridade com a *CYP3A4* (FUKUEN *et al.*, 2002).

A *CYP3A4* é o membro da subfamília *CYP3A* mais expresso em todas as populações estudadas (XIE *et al.*, 2004). 48 SNPs no gene *CYP3A4* foram descritos. Os mais comuns estão apresentados na **Tabela 2**. Entre eles a variante *CYP3A4*1B* (rs2740574), que encontra-se na região promotora 5' do gene, em uma sequência denominada *nifedipine-specific element* (NFSE) (REBBECK *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 1998). O SNP *CYP3A4*1B* já foi associado com aumento no metabolismo da epipodofilotoxina, um agente quimioterápico, funcionando como um fator de proteção para leucemia (FELIX *et al.*, 1998). Este estudo sugere que o polimorfismo está associado com diminuição da expressão ou da atividade da enzima (FELIX *et al.*, 1998). Dados disponíveis online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) indicam que esta

variante tem frequência baixa em indivíduos brancos (2,3 a 2,5%), e frequência em indivíduos negros entre 68 e 82%. Em populações brasileiras, a variante foi encontrada na frequência de 3 a 13% (CAVALLI; HIRATA; HIRATA, 2001; FIEGENBAUM *et al.*, 2005c; CAVALLI *et al.*, 2008). *CYP3A4*1B* foi associada com concentrações de LDL-c maiores após o tratamento de hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina (KAJINAMI *et al.*, 2004). Outros estudos recentes, no entanto, não conseguiram replicar este achado, incluindo dois estudos brasileiros com sinvastatina (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c) e atorvastatina (CAVALLI *et al.*, 2008).

A *CYP3A5* é o principal membro da *CYP3A* expresso em tecidos extra-hepáticos, como rins, pulmões, glândulas adrenais, mama, próstata e leucócitos mononucleares (KUEHL *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002; BURK; WOJNOWSKI, 2004) e parece ter papel fisiológico importante nestes tecidos podendo contribuir para a susceptibilidade a ação de carcinógenos, como os derivados do tabaco que são biotransformados pela *CYP3A5* nos pulmões (BALRAM *et al.*, 2003). A *CYP3A5* é a forma predominante no rim e foi sugerido que a sua expressão polimórfica poderia afetar a geração endógena de 6 β -hidróxicortisol nos néfrons, e consequentemente teria um papel etiológico no controle da pressão arterial através da retenção de sódio e da água (LEE; GOLDSTEIN, 2005).

Dos 23 SNPs descritos para *CYP3A5*, o mais comum é o 6986 A>G (*CYP3A5*3C*, rs776746, **Tabela 2**), localizado no íntron 3, e resulta na incorporação de 131 pb do íntron 3 no RNAm maduro (pseudoéxon 3B). Essa inserção causa uma mudança na fase de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) do RNAm, e pode envolver deleções subsequentes de éxons e/ou inserções de outras seqüências intrônicas. Os RNAm processados anormalmente (RNAm variantes) contêm vários códons de terminação prematuros (PTCs) na ORF, e por isso geram proteínas truncadas (HUSTERT *et al.*, 2001; KUEHL *et al.*, 2001; LEE; GOLDSTEIN, 2005; BUSI; CRESTEIL, 2005). Até o momento foram descritos no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) 8 transcritos para *CYP3A5*. Somente um transcrito é codificante (proveniente do alelo *CYP3A5*1A*), os outros 7 transcritos são RNAm variantes que originam proteínas truncadas. Foi descrito que os RNAm variantes de *CYP3A5* (codificados pelo alelo *CYP3A5*3C*) que possuem o pseudoéxon 3B, são menos estáveis que o RNAm funcional (codificado pelo alelo

*CYP3A5*1A*) (BUSI; CRESTEIL, 2005). A frequência da variante *CYP3A5*3C* é bastante variável entre os diferentes grupos étnicos. Em indivíduos brancos é de 94 a 97%, em asiáticos e populações hispânicas varia de 66 a 75% e em negros de 12 a 37% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). No Brasil, a frequência de *CYP3A5*3C* entre os indivíduos brancos é similar à de outros países europeus com populações caucasianas (76 a 91%) (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c; SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2007; WILLRICH *et al.*, 2008).

SNPs localizados nas regiões não traduzidas (*untranslated region* - UTR) das extremidades 5' e 3' do gene *CYP3A5* também foram descritos (XIE *et al.*, 2004). Foi observado que o SNP *CYP3A5*1D* (rs15524, 31611 C>T), localizado na 3'UTR, está em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP3A5*3C* (HUSTERT *et al.*, 2001; LEE, GOLDSTEIN, 2005), e as duas alterações presentes no mesmo indivíduo formam o alelo *CYP3A5*3A* (KUEHL *et al.*, 2001). Polimorfismos nas UTRs tendem a causar menor estabilidade do RNAm, afetando a taxa de expressão e a atividade catalítica da enzima (XIE *et al.*, 2004).

Tabela 2. Descrição das variantes mais comuns encontradas em *CYP3A4* e *CYP3A5*

Polimorfismo	Alelo	Localização	Efeito sobre a atividade
<i>CYP3A4</i>			
rs2740574	<i>CYP3A4*1B</i> , g.-392A>G	5'UTR	Diminuída
rs35599367	<i>CYP3A4*22</i> , g.15389 C>T	Íntron 6	Diminuída em hepatócitos
rs4987161	<i>CYP3A4*17</i> , g.15615 T>C	Exon 7	Diminuída <i>in vitro</i>
rs28371759	<i>CYP3A4*18</i> , g.20070 T>C	Exon 10	Diminuída
<i>CYP3A5</i>			
rs776746	<i>CYP3A5*3C</i> , g.6986 A>G	Íntron 3	Diminuída
rs15524	<i>CYP3A5*1D</i> , g.31611 C>T	3'UTR	Afetaria a estabilidade do RNAm

Fonte: Home page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Committee. www.cypalleles.ki.se

A variante do gene *CYP3A4*, *CYP3A4*1B* e o alelo expressor de *CYP3A5*, *CYP3A5*1A* estão fortemente ligados, como aponta o estudo de Wojnowski e colaboradores (2002).

Nagai e colaboradores (2002) apontaram que linhagens celulares derivadas de sangue humano expressam RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*. A expressão encontrada em linhagens representantes de linfócitos e macrófagos (MOLT4 e K562) foi proporcional à expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* em linhagem derivada de hepatócitos (HepG2). Watanabe e colaboradores (2004), descreveram a correlação entre a quantidade de RNAm, a quantidade de proteína e a atividade da enzima *CYP3A4*, no fígado. Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou que a atorvastatina modifica a expressão do RNAm do gene *ABCB1* em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e na linhagem celular HepG2 e esse efeito está associado a diferenças na resposta à atorvastatina de indivíduos hipercolesterolêmicos (RODRIGUES *et al.*, 2006; REBECCHI *et al.*, 2009). Portanto, as CMSP têm-se mostrado um bom modelo para avaliar o efeito de estatinas sobre a expressão de diversos genes.

A indução da expressão da subfamília *CYP3A* tem relevância clínica, pois afeta a eficácia do tratamento farmacológico (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004). Entre os indutores conhecidos de *CYP3A* estão xenobióticos como a dexametasona, omeprazol e lovastatina (BURK; WOJNOWSKI, 2004). Muitos destes substratos têm sua taxa de biotransformação aumentada em decorrência da indução da *CYP3A*, o que assegura a detoxificação destes compostos (BURK; WOJNOWSKI, 2004). Com isso, a concentração plasmática desses agentes terapêuticos é diminuída ao longo do tratamento e devem ser reajustadas para garantir a eficácia terapêutica.

Muitas vias contribuem para a regulação da transcrição de *CYP3A4* e *CYP3A5*. O mecanismo molecular envolvido é complexo e sua regulação é afetada por um grande número de receptores nucleares, tais como: Receptores de Pregnano X (PXR), Receptores de Retinóides X (RXR), Receptor Constitutivo de Androstano (CAR), Receptores de Vitamina D (VDR) (WANG *et al.*, 2008). A atorvastatina e a lovastatina são ligantes de PXR e CAR (LEHMAN *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Embora não haja relatos sobre a sinvastatina, é provável, por sua similaridade estrutural com as demais, que também seja um ligante para estes receptores nucleares. Foi demonstrado que os indutores ligam-se diretamente ao PXR e o complexo se liga a seqüências específicas (motivos) na região promotora (5'UTR) de genes da família *CYP3A* (BURK; WOJNOWSKI, 2004). O PXR apresenta domínio de

ligação a xenobióticos e é ativado quando forma um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor X retinóide (RXR). A associação entre o heterodímero PXR-RXR e o ligante (xenobiótico) ativa a transcrição de genes envolvidos na biotransformação e eliminação de fármacos, protegendo as células de ações tóxicas do excesso de xenobiótico ou de seus metabólitos (KLIEWER, 2003).

Concluindo, a resposta farmacológica às estatinas pode ser modificada por vários fatores, principalmente os que alteram a sua biodisponibilidade.

A análise neste estudo de duas estatinas (atorvastatina e sinvastatina) e da ezetimiba nos possibilita esclarecer se os efeitos de aumento de expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* são classe dependentes ou se são característicos de um dos fármacos testados. E ainda, se são efeitos dependentes de estatinas ou dependentes de redução do colesterol, uma vez que a ezetimiba não é metabolizada por *CYP3A4* e *CYP3A5*.

Poucas enzimas são tão versáteis e tem uma gama tão ampla de substratos como as enzimas do citocromo P450. Sua onipresença em diversos tecidos sugere que seu papel como enzima de biotransformação é essencial na capacidade de adaptação dos organismos ao seu meio ambiente. Com o reconhecimento dos efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão e a atividade de *CYP3A4* e *CYP3A5* em linhagens celulares derivadas de hepatócitos e enterócitos humanos, bem como em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos hipercolesterolêmicos, esperamos contribuir para o conhecimento de fatores e mecanismos farmacogenômicos envolvidos na variabilidade de resposta ao tratamento com hipolipemiantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de inibidores de síntese (estatinas) e absorção (ezetimiba) de colesterol sobre a expressão gênica e a atividade das enzimas de biotransformação *CYP3A4* e *CYP3A5*, em linhagens celulares derivadas de hepatócitos e enterócitos e em células mononucleares de indivíduos hipercolesterolêmicos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar o efeito das estatinas (atorvastatina e sinvastatina) e ezetimiba sobre a expressão do RNAm dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5*, em linhagens derivadas de hepatócitos (HepG2) e de enterócitos (Caco-2).
- Medir a expressão das proteínas *CYP3A4* e *CYP3A5*, em células HepG2 após tratamento com estatinas.
- Estudar a associação do grupo haplotípico formado pelas variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* sobre a expressão de RNAm e das proteínas *CYP3A4* e *CYP3A5*, em células HepG2 e Caco-2.
- Avaliar o efeito das estatinas sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*, em células mononucleares do sangue periférico de hipercolesterolêmicos, e sua relação com a presença do grupo haplotípico formado pelas variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudos *in vitro*

3.1.1 Cultivo das células HepG2 e Caco-2

As linhagens derivadas de hepatoma humano (HepG2, número ATCC® HB 8065) e de adenocarcinoma colorretal (Caco-2, número ATCC® HTB-37), ambas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, sob a direção do Prof. Dr. Radovan Borojevic, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), foram escolhidas por representarem células derivadas de hepatócitos e enterócitos, sítio de ação dos fármacos em estudo (estatinas e ezetimiba, respectivamente).

As células foram mantidas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, pH 7,4) com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de gás carbônico. O meio de cultivo foi suplementado com L-glutamina 2 mmoles/L, bicarbonato de sódio 44 mmoles/L, estreptomicina 10.000 U/mL e penicilina 10.000 U/mL. O meio foi trocado duas vezes por semana e as células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) e subcultivadas uma vez por semana.

3.1.2 Tratamento das células com hipolipemiantes

A atorvastatina, doada pela Pfizer Farmacêutica Ltda., São Paulo, BR, foi dissolvida em metanol PA (Merck S.A., São Paulo, BR). A concentração final de metanol no meio de cultura nunca excedeu 0,1%. A sinvastatina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi dissolvida em etanol PA (Merck S.A., São Paulo, BR) e foi ativada segundo o protocolo de Sadeghi e colaboradores (2000) que segue: hidróxido de sódio 0,1N foi adicionado à solução que, em seguida foi incubada a 50 °C por 2 h. O pH foi ajustado para 7,0 com ácido clorídrico e a concentração final da solução foi estabelecida em 5,6 mmoles/L. A solução foi mantida a 4 °C. A concentração final de etanol no meio de cultura não excedeu 1% para os experimentos de proliferação e viabilidade celular e 0,2% para os experimentos de expressão gênica. Experimentos preliminares com esta concentração de etanol não mostraram citotoxicidade. A ezetimiba, gentilmente doada pela Merck/Schering-Plough (New Jersey, EUA), foi dissolvida em etanol PA (Merck S.A., São

Paulo, BR). A concentração final de etanol no meio de cultura nunca excedeu 0,2%. Experimentos preliminares com estas concentrações não mostraram citotoxicidade.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM na ausência (controle: etanol ou metanol) e na presença de concentrações variáveis de atorvastatina (0,1 a 20 μM), sinvastatina ácida (0,01 a 10 μM) e/ou ezetimiba (0,5 a 5 μM) por 24h.

As doses de sinvastatina e atorvastatina utilizadas relacionam-se com as concentrações sanguíneas das estatinas em pacientes tratados com 10 a 80 mg de qualquer um dos fármacos. Assumindo completa absorção das estatinas, com 10 a 80 mg de sinvastatina e de atorvastatina são estimadas concentrações sanguíneas de 1,8 a 18 μM (em um homem de 70 kg com volemia de 5L) (MOHAMMADI *et al.*, 1998; BONN *et al.*, 2002).

A dose máxima de ezetimiba (5 μM) utilizada nesse estudo foi uma condição estabelecida pela fabricante do fármaco. No entanto, segundo During e colaboradores (2005) ela também é fortemente relacionada à concentração farmacologicamente ativa (2,5 mg/L ou aproximadamente 6 μM – P.M. 409,4) que deveria ser encontrada no intestino delgado de um homem adulto após ingerir a dose recomendada de 10mg de ezetimiba ao dia.

As concentrações de ezetimiba e sinvastatina avaliadas na linhagem Caco-2 foram selecionadas com base em trabalhos já publicados na literatura (YAMANASHI; TAKADA; SUZUKI *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009a).

3.1.3 Curva de crescimento e tempo de dobramento celular

Ensaio de curvas de crescimento das células HepG2 e Caco-2 foram realizados em triplicata, a partir de suspensões de células (4×10^4 células/mL) semeadas em placas de 6 poços com volume final de 2 mL de meio de cultura DMEM. As células foram mantidas em cultura durante quatro dias e o número de células foi determinado a cada 12 h por microscopia óptica, utilizando a câmara de Neubauer. O tempo de dobramento das populações celulares (TDC) HepG2 e Caco-2 foi calculado de acordo com as fórmulas:

$$\text{TDC} = \frac{1}{r}$$
$$\text{e}$$
$$r = 3,32 (\log N_h - \log N_i) / (t_2 - t_1)$$

Onde:

r = taxa de multiplicação celular,

N_h = número de células coletadas em um determinado período de tempo (t_2),

N_i = número de células inoculadas no tempo zero (t_1).

3.1.4 Efeito de estatinas sobre a viabilidade celular, fragmentação de DNA e ciclo celular

A porcentagem de células viáveis após tratamento com atorvastatina ou sinvastatina por até 72 h foi avaliada a partir de uma suspensão de 1×10^6 células/mL, semeadas em placas de 6 poços com volume final de 2 mL de meio de cultura DMEM, por citometria de fluxo, utilizando uma solução de iodeto de propídio (PI) ($0,2 \mu\text{g/mL}$ em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2-7,4). O PI é um composto fluorescente altamente solúvel em água que se liga diretamente ao DNA, intercalando-se entre as bases nitrogenadas, com pouca ou nenhuma preferência por alguma sequência

específica; no entanto, não consegue ultrapassar membranas intactas, sendo, portanto, excluído de células viáveis. A perda da integridade de membrana é determinada quando a fluorescência emitida pelo PI aumenta, já que este composto não passa pelas membranas intactas. Foram realizados de 3 a 6 experimentos independentes, em duplicata.

A quantificação de DNA fragmentado foi realizada em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Nicoletti e colaboradores (1991). Brevemente, 5×10^5 células foram ressuspensas em 0,2 mL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100) contendo 50 µg/mL de PI. As células lisadas foram incubadas no escuro a 4 °C de 2 a 24 h e utilizadas para a análise de fragmentação do DNA. O PI liga-se às bases nitrogenadas e a fragmentação é observada pelo aparecimento de partículas pouco fluorescentes, evidenciando que o DNA foi clivado. Devido à alta condensação e pequeno tamanho de fragmentos do DNA clivado, o PI não consegue ligar-se eficientemente às bases.

As células foram avaliadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando o programa de informática *Cell Quest* (Becton Dickinson, CA, EUA). Como o PI emite fluorescência na faixa da cor laranja, a fluorescência foi determinada através do filtro FL2 (620 nm). Para cada teste, foram avaliados 10.000 eventos.

Os resultados obtidos nos experimentos com atorvastatina e sinvastatina para a curva de crescimento, viabilidade e fragmentação celular, bem como o ciclo celular estão apresentados no **Apêndice 1**.

3.1.5 Estudo das variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*

3.1.5.1 Extração e análise do DNA genômico das linhagens celulares

O DNA genômico foi extraído utilizando o método de fenol: clorofórmio, (SAMBROOK; RUSSEL, 2000). Resumidamente, 500 µL de uma suspensão de células HepG2 e Caco-2 foram colocados em um microtubo, e 500 µL da solução de fenol equilibrado (pH 7,8-8,0) e clorofórmio (1:1) foi adicionado à amostra. Após 20 s de

agitação mecânica, a suspensão foi centrifugada durante 5 min a 12.000 rpm. A fase aquosa, que contém o DNA, foi removida e colocada em novo microtubo. Este processo foi repetido 2 vezes. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol absoluto ao tubo contendo a fase aquosa e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5 min a 12.000 rpm, lavado com etanol 70% e ressuspensionado em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10 mM e EDTA 1 mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2000). A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, São Paulo, BR). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 1.000bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2000) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemImager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; RUSSEL, 2000).

3.1.5.2 Sequenciamento de HepG2 e Caco-2 para as variantes estudadas

As linhagens celulares HepG2 e Caco-2 foram genotipadas para as variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* por sequenciamento de DNA. Para amplificação por PCR, foram utilizados os iniciadores descritos na **Tabela 3**. Os protocolos desses ensaios estão descritos em trabalhos já publicados (CAVALLI; HIRATA; HIRATA, 2001; CAVALLI *et al.*, 2008; WILLRICH *et al.*, 2008).

Os produtos de PCR para as variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* foram purificados utilizando-se colunas de purificação por tamanho molecular (Microspin S300HR Columns, GE Healthcare, São Paulo, BR), segundo as instruções do

fabricante. Estes produtos purificados e os iniciadores diluídos a 5 µM foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a realização do ensaio de sequenciamento. Os produtos de sequenciamento foram injetados no sistema de eletroforese capilar MegaBACE 1000 (GE Healthcare, São Paulo, SP), conforme protocolo do Centro de Estudos do Genoma Humano. A análise da eletroforese foi feita pelo programa de informática Sequence Analyser do MegaBACE utilizando o BaseCaller Cimarron 3.12. Num segundo momento, as sequências foram analisadas utilizando-se o programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 5.0.9, disponível na página da *Internet* www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html (2004).

Tabela com variantes mais comuns dos genes? Atividade diminuída, localização, etc?

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.

Polimorfismos	Sequências dos Iniciadores	Tamanho do fragmento	Sequência Referência
<i>CYP3A4</i> *1B, -392A>G rs 2740574	5'GGGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGg*A 3' 5'CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG 3'	385pb	NM_017460.5
<i>CYP3A5</i> *3C, 6986A>G rs 776746	5' TTGTGAGCACTTGATGATTACCC3' 5' CCAGGAAGCCAGACTTTGAT3'	370pb	NM_000777.3
<i>CYP3A5</i> *1D, 31611C>T rs 15524	5' TGCTTTTACTATCCAGTATTTACCC3' 5' GCCCATCTTTATTCAAGGTTT3'	378pb	NM_000777.3

Nota: Sequência referência, Fonte: Genbank. Alelos denominados pelo Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

* Base modificada de C para G para geracao do sítio de clivagem. É um iniciador *mismatched*.

3.1.6 Expressão de RNAm dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5*

3.1.6.1 Isolamento e avaliação do RNA total

O RNA foi extraído a partir de uma suspensão de células das linhagens celulares HepG2 ou Caco-2, contendo entre 5 a 10 x 10⁶ células/mL, lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL^R (Invitrogen Corporation, CA, EUA) (SALAZAR *et al.*, 2000b;

RODRIGUES *et al.*, 2009a). Resumidamente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados 12.000 *g*, 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). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 100µL de água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), incubado por 10 min a 56 °C e armazenado a -70 °C para posterior análise.

O RNA total isolado foi quantificado (A 260nm) seu grau de pureza foi medido (A_{260nm}/A_{280nm}) por espectrofotometria no UV (SAMBROOK; RUSSEL, 2000) com a utilização do equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). A integridade do RNA de algumas amostras foi avaliada com a utilização da plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, AL).

3.1.6.2 Expressão gênica em células HepG2 e Caco-2

Para os experimentos de análise de expressão de RNAm, as células HepG2 foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células por 75 cm², cultivadas por 24 h e então tratadas com sinvastatina (0 a 10 µM) ou atorvastatina (0 a 20 µM) pelo mesmo tempo (6, 12 ou 24 h). As células Caco-2 foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células por 75 cm², cultivadas por 2 dias e então tratadas com atorvastatina ou sinvastatina (0 a 1 µM) durante 12 ou 24 h.

A expressão do RNAm dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5* nas linhagens celulares foi quantificada por reação de transcrição reversa (RT) seguida de amplificação por PCR em tempo real quantitativo (PCRq). Em paralelo, foi medida a expressão de RNAm dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para estudo de expressão em HepG2 e hidroximetilbilano sintase (HMBS) para estudo da expressão em Caco-2 como referência endógena. A escolha do gene de referência endógena para cada tipo celular foi realizada utilizando-se o programa geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

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.

O cDNA foi amplificado utilizando-se iniciadores (senso e antisenso) a 10 µmoles/L e sondas de detecção marcadas com FAM (gene de interesse) e VIC (gene referência) a 5 µmoles/L. Os demais reagentes foram fornecidos em solução concentrada duas vezes *TaqMan® Universal PCR master mix* (MgCl₂ 5 mM, dNTPs 400µM, AmpErase^R UNG 30U, enzima AmpliTaq Gold 250 U e tampão de reação *Gold PCR Buffer*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Utilizou-se 1 µL do cDNA, num volume total de 25 µL. Para os ensaios de PCRq foi utilizado o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências dos iniciadores de referência endógena do gene *GAPDH* foram cedidas pela Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e para o gene HMBS as sequências foram previamente descritas na literatura (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Por sua vez, as sondas dos dois genes de referência endógena (*GAPDH* e *HMBS*), assim como as sequências dos iniciadores e das sondas marcadas com fluoróforos para os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* foram desenhadas utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (**Tabela 4**). As condições de termociclagem do PCRq foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

Tabela 4. Iniciadores utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')
<i>CYP3A4</i>	Iniciador Sense	TCAATAACAGTCTTTCCATTCTCAT
	Iniciador Antisense	TTCGAGGCGACTTTCTTTCATC
	Sonda	FAMTM TGTTC AAGAGAAGTTAC MGBNFQ
<i>CYP3A5</i>	Iniciador Sense	CTATCGTCAGGGTCTCTGGAAATT
	Iniciador Antisense	ACGTTCCCCACATTTTCCATA
	Sonda	FAMTM ACACAGAGTGCTATAAA MGBNFQ
<i>GAPDH</i>	Iniciador Sense*	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
	Iniciador Antisense*	CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC
	Sonda	VIC[®] TCAGCCTTGACGGTGC MGBNFQ
<i>HMBS</i>	Iniciador Sense#	GGCAATGCGGCTGCAA
	Iniciador Antisense#	GGGTACCCACGCGAATCAC
	Sonda	VIC[®] CGGAAGAAAACAGCC MGBNFQ

Nota: FAMTM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; MGB, *minor groove binder*; NFQ, *non-fluorescent quencher*; VIC[®], fluoróforo disponibilizado pela Applied Biosystems[®]. *Sequências de iniciadores gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças (ICB, USP). # Sequências de iniciadores de VANDESOMPELE *et al.*, 2002.

As eficiências dos ensaios de amplificação foram calculadas utilizando-se curva padrão obtida da relação entre diferentes quantidades de cDNA em log e respectivos valores de ciclo *threshold* (C_T). A eficiência (E) dos ensaios foi calculada pela fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$$

A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Por esse método a quantidade de transcrito calculada para cada gene em uma amostra é normalizada pela do respectivo gene de referência. A seguinte fórmula foi utilizada para calcular a expressão gênica nas linhagens celulares:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Sendo:

$\Delta C_T = C_T$ gene de interesse - C_T gene constitutivo;

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ da amostra tratada – ΔC_T da amostra controle.

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram realizados controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com produtos de PCR.

3.1.6.3 Avaliação da eficiência dos iniciadores e sondas

Inicialmente foram realizados ensaios de PCRq com diferentes concentrações de iniciadores e sondas, no caso dos ensaios onde estes dois componentes foram adquiridos separadamente (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *GAPDH*, *HMBS*). Após esses testes, foram selecionadas as concentrações que mesmo após aumento da concentração não modificavam o C_T , ou seja, a quantidade suficiente para saturar o sistema.

Então, para todos os ensaios, foram analisadas diluições seriadas de cDNA. Os dados da concentração de cDNA (em log) *versus* C_T para cada ensaio de amplificação originou uma curva-padrão, cujo coeficiente angular da reta foi utilizado para cálculo de eficiência do respectivo ensaio. As eficiências de amplificação foram de 90,1%; 102,1%; 102,9% e 109,7% para os genes *HMBS*, *GAPD*, *CYP3A4* e *CYP3A5* respectivamente, conforme a **Tabela 5** e as curvas-padrão na **Figura 4**.

Tabela 5. Eficiência do PCRq para os genes estudados.

	<i>CYP3A4</i>	<i>CYP3A5</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HMBS</i>
<i>Coefficiente angular</i>	-3,1095	-3,2548	-3,2732	-3,5834
r^2	0,9962	0,9570	0,9912	0,9975
Eficiência (%)	109,7	102,9	102,1	90,1

Nota: As eficiências dos ensaios de amplificação foram calculadas utilizando-se curva padrão obtida da relação entre diferentes quantidades de cDNA em log e respectivos valores de ciclo *threshold* (C_T). A eficiência (E) dos ensaios foi calculada pela fórmula $E=10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%.

Figura 4. Representação da curva-padrão de PCRq para medida de expressão de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *GAPD* e *HMBS*. A eficiência foi estimada pela análise de regressão linear do gráfico obtido pela relação C_T versus log da concentração de cDNA (ng).

3.1.7 Expressão de proteínas CYP3A4 e CYP3A5 por *Western Blotting*

Para a extração e separação das proteínas das células HepG2 em cultura, a suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 min e o sedimento ressuspenso em tampão RIPA (50 mM Tris [pH 8,0]; 150 mM NaCl; 0,5% Na₃KH₂PO₄; 1% Triton X-100; 0,1% SDS, 2 µg/mL aprotinina, 5 µg/mL leupeptina, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 µg/mL pepstatina A) por 15 min em gelo. As células foram agitadas em agitador de tubos, em velocidade máxima por 30 s e então centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C (DEY *et al.*, 2003). O sobrenadante foi reservado e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) segundo Sambrook e Russel (2000). Uma alíquota com 50 µg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; mercaptoetanol 5%; SDS 2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%) foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes. As proteínas fracionadas em gel foram transferidas para membrana de PVDF através de sistema semi-seco, em cuba de eletroforese (15V por 1 h). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de PVDF em Ponceau S 0,2% por 10 min.

A detecção de CYP3A4 foi realizada inicialmente por bloqueio da membrana por 2 h a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBS [Tris-HCl 20 mM, (pH 7,5), NaCl 0,9%] para minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, a membrana foi incubada, sob agitação, em TBST (TBS com 0,1% de Tween 20) com BSA 1%, contendo o respectivo anticorpo primário (diluído 1:100), por 1 h 30 min para CYP3A4, em temperatura ambiente. Na **Tabela 6** estão apresentados os anticorpos usados nos ensaios de *Western Blotting*, assim como a diluição e o fabricante. Após três lavagens por 10 min com TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo de carneiro anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (diluído 1: 2.000, em TBST) por 2 h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir a membrana foi lavada três vezes por 10 min com TBST.

Para a realização do *Western Blotting* de CYP3A5, foi utilizado o sistema SNAP id®, da Millipore (Billerica, MA, EUA), que é um sistema para detecção de proteínas em membranas de Western Blot a vácuo. O sistema é conectado a uma bomba de vácuo, com isso os anticorpos conseguem penetrar de forma mais eficiente nas membranas, e os tempos de incubação são extremamente reduzidos quando comparados com o *Western Blotting* tradicional. Todo o processo, a partir da etapa do bloqueio da membrana, demora cerca de 30 min.

O sistema SNAP id® é utilizado a partir da etapa do bloqueio, e o protocolo de uso foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As membranas de PVDF foram obtidas da mesma forma que para CYP3A4. Resumidamente, as membranas foram inseridas nos *blot holders* do sistema SNAP id®, e incubadas com solução de bloqueio contendo 0,5% de BSA em TBST, por cerca de 30 s, tempo que o sistema leva para sugar a solução de bloqueio, que com a ação do vácuo se distribui de forma homogênea sobre a membrana. A seguir, o anticorpo primário anti-CYP3A5 foi adicionado (1:500, em TBST) à membrana com tempo de incubação de 10 minutos. O vácuo é acionado após este período, e permanece ligado durante as três lavagens com TBST. A seguir, as membranas foram incubadas por 10 minutos com o anticorpo de carneiro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (diluído 1: 3.000, em TSBT), seguidas de três lavagens com TBST.

As bandas marcadas pelos anticorpos foram visualizadas utilizando o “*kit ECL Western Blot detection reagents*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). A expressão de CYP3A4 e de CYP3A5 foi analisada em relação à expressão de β -actina (42 KDa), diluído 1: 5.000 em TBST no sistema tradicional ou 1: 4.000 no sistema SNAP id®.

Tabela 6. Anticorpos primários usados nos ensaios de *Western Blotting*.

Proteína	Peso molecular (KDa)	Anticorpo usado	Diluição	Fabricante
CYP3A4	50	(HL3): sc-53850	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA
CYP3A5	57	AB1279	1:500	Chemicon; Millipore Corp., Billerica, MA, EUA
β -actina	42	sc-130300	1:5000 ou 1:4000 (SNAPid®)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA

As imagens de CYP3A4 foram fotografadas após revelação de filmes de raio-x, e as de CYP3A5 foram fotodocumentadas através do sistema ImageQuant 400 Capture (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

CYP3A4 e CYP3A5 foram quantificadas através de densitometria em relação à β -actina no sistema Image J v.1.45g (<http://imagej.nih.gov/ij>). disponível *online* pelo *National Institutes of Health* (NIH), EUA.

3.2 Estudos *in vivo*

3.2.1 Casuística

Foram selecionados para este estudo 458 indivíduos, de ambos os sexos, entre 29 e 81 anos de idade. Destes, 210 eram hipercolesterolêmicos (HC) e 248 normolipidêmicos (NL). Foram excluídos deste estudo os indivíduos que se declararam orientais (amarelos), indivíduos com doenças cardiovasculares, com alguma forma de hipercolesterolemia secundária, doença tiroideana, hepática ou renal grave ou diabetes melito, conhecidos antes ou após a avaliação laboratorial, e mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais. Além disso, foram excluídos os indivíduos hipercolesterolêmicos selecionados que responderam adequadamente (LDL-c inferior a 160 mg/dL) à dieta com baixo teor de colesterol e gordura saturada e os que não completaram as fases do tratamento farmacológico. Com base nestes critérios, foram

excluídos 71 HC e 149 NL, sendo efetivamente incluídos 139 HC e 99 NL que completaram o estudo.

Os indivíduos HC tinham colesterol total superior a 200 mg/dL e LDL-c superior a 160 mg/dL, triglicerídeos inferiores a 350 mg/dL. Também foram incluídos 99 indivíduos normolipidêmicos (NL), segundo os critérios de hipercolesterolemia primária da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Os indivíduos foram selecionados em duas diferentes instituições: a Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (n=61), a Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (n=78) durante consultas de rotina.

Todos os indivíduos foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética em pesquisa das instituições envolvidas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Hospital Universitário da USP e Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (**Anexo 3**) e somente participaram os que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram obtidos os dados de gênero, idade, peso, altura, menopausa, tabagismo, hipertensão, história familiar de DAC e medicações em uso. Com base nas recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000), indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) superior a 30 kg/m² foram classificados como obesos, e os que apresentaram pressão sistólica/diastólica acima de 140/90 mmHg ou estavam sob tratamento anti-hipertensivo foram considerados hipertensos (MANCIA *et al.*, 2007). A etnia do paciente foi determinada durante a entrevista, por ele próprio (autodeclaração) (IBGE, 2010).

Os indivíduos NL foram selecionados durante consulta médica de rotina e compareceram uma única vez ao serviço de Laboratório Clínico para coleta das amostras de sangue e urina. Foram instruídos a manter sua dieta e hábitos regulares no período que antecedeu a coleta, assim como as medicações de uso contínuo. Os NL não faziam uso de nenhum hipolipemiante.

Os indivíduos HC foram orientados a fazer uso de dieta com baixo teor de colesterol e gordura saturada por quatro semanas (CHAHOUDE; AUDE; MEHTA, 2004).

Após esse período, foi feita avaliação laboratorial e os indivíduos com concentrações séricas de LDL-c superiores a 160 mg/dL (n=139) foram tratados com atorvastatina (HC) com a dose diária de 10 mg por via oral durante quatro semanas.

3.2.2 Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue, após jejum de 12 a 14 h, no período basal e após o protocolo de tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas. Para extração de DNA e RNA foram obtidos 15 mL de sangue em tubo a vácuo do tipo BD Vacutainer® (BD Diagnostics, São Paulo, BR), com EDTA K₂ jateado na parede do tubo e 5 mL em tubo seco com gel separador e ativador de coágulo jateado na parede do tubo (Gel SST II® Advance, BD Diagnostics, São Paulo, BR) para a obtenção de soro. Foram determinadas concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteína AI (apo AI) e apolipoproteína B (apo B). As determinações bioquímicas aqui descritas foram realizadas no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo ou no Laboratório Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas (Cascavel, PR). As determinações de colesterol total e frações, triglicérides, apo AI e apo B séricos foram utilizadas a fim de avaliar a resposta aos hipolipemiantes.

Dos pacientes do grupo tratado com atorvastatina (HC) e dos normolipidêmicos (NL) também foi colhida uma amostra de urina isolada (primeira urina da manhã) em cada fase do protocolo, para estimar a atividade de CYP3A4 e CYP3A5 através da conversão do cortisol urinário a 6 β -hidróxicortisol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e para determinação de creatinina urinária (Reação de Jaffé, amostra diluída 1:25 em água deionizada).

3.2.3 Estudo das variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*

3.2.3.1 Extração e análise de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina (SALAZAR *et al.*, 1998). Resumidamente, as amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10 mM (pH 8,0), KCl a 10 mM; MgCl₂ a 10 mM e EDTA a 2 mM] adicionado de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0 e NaCl 0,4M) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A seguir, foi adicionado NaCl 5 M e a suspensão foi centrifugada durante 5 min a 12.000 rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5 min a 12.000 rpm, lavado com etanol 70% e ressuspensionado em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10 mM e EDTA 1 mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

A integridade das amostras e a quantificação de DNA foram avaliadas da mesma forma que as linhagens celulares, portanto já descritas no item 3.1.5.1.

3.2.3.2 Genotipagem das variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*

Três variantes foram estudadas: *CYP3A4*1B* (*CYP3A4* -392A>G, 5'UTR, rs2740574), *CYP3A5*3C*, (*CYP3A5* 6986 A>G, íntron 3, rs776746) e *CYP3A5*1D* (*CYP3A5* 31611C>T, 3'UTR, rs15524). As regiões polimórficas *CYP3A4*1B* e *CYP3A5*3C* foram amplificadas por PCR de ponto final e os produtos gerados foram analisados por ensaio de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Vinte por cento das amostras foram selecionadas aleatoriamente para confirmação dos genótipos encontrados, através de sequenciamento de DNA. Para análise do polimorfismo *CYP3A5*1D* foi utilizado diretamente o sequenciamento de DNA. Os protocolos de

PCR-RFLP foram executados com base em trabalhos previamente publicados por nosso grupo de pesquisa (CAVALLI; HIRATA; HIRATA, 2001; WILLRICH *et al.*, 2008).

3.2.4 Expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células mononucleares

3.2.4.1 Isolamento e avaliação do RNA total

O RNA total foi extraído de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) que foram previamente separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, MO, EUA) densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (SALAZAR *et al.*, 2000b). Resumidamente, 5 mL de sangue colhido em EDTA foram diluídos 1:2 (v/v) com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 10 mM, pH 8,0). A seguir, esse volume foi cuidadosamente pipetado sobre 3,5 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, MO, EUA) contido em tubo cônico de 15 mL que foi centrifugado a 800 *g* por 30 min a temperatura ambiente. As células mononucleares foram recolhidas, lavadas três vezes com o dobro do seu volume com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 10 mM, pH 8,0), contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

As CMSP (1 a 5×10^6 células) foram lisadas com 1 mL de TRIZOL^R (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o mesmo procedimento executado para as linhagens celulares HepG2 e Caco-2, previamente padronizado em nosso laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2009a) e já descrito no item 3.1.6.1.

3.2.4.2 Expressão gênica por PCR em Tempo Real Quantitativo (PCRq)

A medida quantitativa da expressão do RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP foi realizada por PCRq utilizando o sistema de amplificação *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que foi empregado também para análise das linhagens celulares HepG2 e Caco-2, já descrito no item 3.1.6.2. A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene *GAPDH*

como controle endógeno. A escolha do gene de referência endógena foi realizada utilizando-se o programa geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Para a quantificação da expressão gênica em CMSP foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta C_T}$$

Onde:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ gene constitutivo.}$$

A variação da expressão basal e após tratamento com atorvastatina foi medida através da fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Onde:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ gene constitutivo;}$$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ atorvastatina}) - (\Delta C_T \text{ basal}).$$

Diferentemente da fórmula usada para as linhagens celulares ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), na análise das CMSP não há uma amostra “controle” ou referência.

3.2.5 Análise da atividade de CYP3A *in vivo*

Para análise da atividade de CYP3A *in vivo* utilizamos a medida da taxa de biotransformação de Cortisol a 6β-hidróxi-cortisol (6βOHC), seu metabólito ativo, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em amostras de urina. Esta reação é mediada por CYP3A4 e CYP3A5. Como ambas as enzimas tem sobreposição de

substratos, não é possível determinar qual a contribuição individual de cada uma delas, portanto a razão 6 β OHC/cortisol é uma medida indireta da atividade do *pool* de CYP3A4 + CYP3A5 presentes no indivíduo, sendo doravante denominada atividade de CYP3A (LUO *et al.*, 2009).

O ensaio requer unicamente uma amostra de urina, e atualmente é o único método não invasivo para avaliar a atividade de CYP3A (ROUITS *et al.*, 2003). Esta análise indireta é utilizada clinicamente para determinar o fenótipo de CYP3A4/5 em pacientes em uso de medicamentos metabolizados por essas enzimas. É considerada uma boa inferência, pois espera-se que a atividade de metabolização de xenobióticos da CYP3A4 e CYP3A5 seja diretamente proporcional à atividade de catálise de reações endógenas como a biotransformação do cortisol a 6 β OHC-cortisol, afinal a indução de CYP3A4/5 por compostos endógenos como hormônios esteroidais ou por xenobióticos é mediada pelos mesmos receptores: Receptores de Pregnano X (PXR), Receptor Constitutivo de Androstano (CAR) e Receptores de Vitamina D (VDR) (WANG *et al.*, 2008).

Amostras de urina (volume de 15 a 50 mL) foram colhidas no período da manhã (entre 6h e 9h), antes e após o tratamento com atorvastatina, dos indivíduos HC. Dos indivíduos NL uma única amostra foi obtida.

3.2.5.1 Reagentes

Todos os reagentes usados para o ensaio eram grau HPLC e foram adquiridos da Merck (Merck do Brasil Ltda, São Paulo, BR). Os padrões de referência cortisol e 6 β OHC (**Figura 5**) e o padrão interno dexametasona foram adquiridos da Sigma Aldrich do Brasil Ltda (São Paulo, BR) e o grau de pureza dos mesmos era superior a 98%. As soluções padrão foram preparadas em metanol grau HPLC, na concentração de 1mg/mL.

Figura 5. Estrutura química do cortisol e seu metabólito 6β-hidróxicortisol, após oxidação pelo citocromo P450 3A4 e 3A5.

Fonte: Rouits *et al.*, 2003.

3.2.5.2 Dosagem de creatinina urinária

Uma alíquota (1mL) de todas as amostras de urina foi utilizada para dosagem de creatinina urinária, através da Reação de Jaffé, com a urina diluída 1:25 em água deionizada. Os testes foram realizadas em analisador automatizado Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostica, São Paulo, BR). As amostras que apresentaram resultados fora dos valores de referência para o método (Homens, de 39 a 259 mg/dL; Mulheres, de 28 a 217 mg/dL) foram excluídas dos ensaios de CLAE, pois indicam uma provável degradação da amostra.

3.2.5.3 Extração líquido-líquido das amostras de urina

Primeiramente, 200 µL do padrão interno dexametasona [1 mg/mL] foram adicionados a 500 µL das amostras de urina e homogeneizados em agitador mecânico do tipo vórtex. A seguir, foram adicionados 5 mL de diclorometano. Após homogeneização vigorosa por 1 minuto, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 3200 g em temperatura ambiente. A fase orgânica foi removida da solução e evaporada a 40 °C sob corrente de nitrogênio. A seguir, a amostra foi reconstituída com 200 µL de fase móvel composta por metanol e água (60:40, v/v).

3.2.5.4 Condições cromatográficas

Os ensaios de CLAE foram realizados pelo Setor de Toxicologia do Laboratório Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas (Cascavel, PR). Foi utilizado o cromatógrafo modelo LC-2010A HT da Shimadzu (Shimadzu do Brasil, São Paulo, BR). Utilizou-se a coluna LUNA C18 100Å 150 x 4,6 mm x 5 µm (Phenomenex Inc, Torrance, CA, EUA). A análise cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente, com um fluxo de 1,0 mL/min, utilizando-se como fase móvel solução contendo metanol e água (60:40, v/v). 60µL de amostra foram injetados no cromatógrafo. A detecção foi estabelecida em detector UV (245 nm).

3.2.5.5 Otimização do método de CLAE para dosagem de cortisol e 6β-OH-cortisol

As amostras de urina dos indivíduos dos grupos HC e NL foram armazenadas a -80 °C durante todo o período que antecedeu à análise. Os ensaios de padronização do método foram realizados utilizando-se uma matriz de urina diluída 1:50 em água ultrapura. As soluções padrão se mostraram estáveis por até 3 meses, quando armazenadas a -20 °C.

A fim de avaliar a recuperação do método de extração, foram adicionados 100 ng de cortisol e 100 ng de 6βOHC em amostra de 500 µL urina diluída 1:50 antes do procedimento de extração (n=6). A recuperação após a extração foi de 92% ± 8% para o PI dexametasona (média ± desvio padrão), 85% ± 7% para o cortisol e 81% ± 12% para o 6βOHC.

O limite de quantificação (LQ) foi de 1 µg/L para o cortisol, 1 mg/L para o 6βOHC. O limite de detecção (LD) foi de 1 µg/L para o cortisol e 100 µg/L para 6βOHC.

A exatidão foi de 105% para o cortisol e 78% para o 6βOHC. A faixa de linearidade foi de 1-400 µg/L ($r^2 = 0,9932$) para o cortisol e 1-500 mg/L ($r^2 = 0,9931$) para o 6βOHC. As curvas de calibração continham 8 pontos (n=5).

Figura 6. Cromatograma de uma amostra de urina com os picos de Cortisol (tempo de retenção: 4,115 min) e Dexametasona (tempo de retenção: 6,367 min).

Nota: como a escala do cromatograma é muito diferente para Cortisol e 6 β OHC, os dois analitos são visualizados em separado.

Figura 7. Cromatograma de uma amostra de urina com os picos de 6 β hidróxicortisol (tempo de retenção: 2,054 min) e Dexametasona (tempo de retenção: 6,367 min).

Nota: como a escala do cromatograma é muito diferente para Cortisol e 6 β OHC, os dois analitos são visualizados em separado.

Na **Figura 6**, é mostrado o cromatograma de uma amostra de urina para quantificação simultânea do cortisol, 6 β OHC e dexametasona. Os picos à esquerda (6 β OHC) e à direita (dexametasona) são melhor observados na **Figura 7**, na qual a escala do eixo y (mV) foi amplificada.

3.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se os programas de informática SigmaStat versão 3.5 (Systat Programa de informática, Inc., CA, EUA) e GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Programa de informática Inc., CA, EUA). O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Para os estudos *in vitro*, o Teste-*t* ou Mann-Whitney (*Wilcoxon Rank Sum Test*) foi utilizado para comparar os valores de expressão gênica entre células tratadas com o veículo (metanol ou etanol) e células não tratadas. Diferenças entre as médias dos tratamentos com atorvastatina, sinvastatina e/ou ezetimiba e dados de expressão basal dos genes avaliados foram analisadas por *One-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Variações entre as médias dos tratamentos com estatinas em diferentes tempos e análise do número de células, tempo de dobramento celular (TDC), viabilidade, fragmentação, ciclo celular e expressão dos genes avaliados foram analisadas por *Two-way* ANOVA seguido por teste de Bonferroni.

Nos estudos *in vivo*, foi realizada análise descritiva dos parâmetros bioquímicos basais para os grupos HC e NL, e antes e após o tratamento com atorvastatina no grupo HC. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Para comparar os valores de uma variável quantitativa antes e após tratamento foi utilizado o Teste-*t* pareado ou o teste de Mann-Whitney. Para a análise da expressão gênica *in vivo*, os indivíduos foram comparados por Teste-*t* ou *One Way* ANOVA.

Para as análises dos polimorfismos genéticos, a avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação (avaliado usando o índice D' e os valores de r^2) foram realizadas usando o programa SNPAnalyzer, disponível *online* (YOO; SEO; KIM; 2005). As frequências dos grupos haplotípicos e análise pareada entre os grupos haplotípicos comparados com o haplótipo de referência (definido como AGT) foram determinadas usando o programa de informática HaploStats (SCHAID *et al.*, 2002; LAKE *et al.*, 2003).

Análise de regressão linear univariada foi realizada para determinar associação entre os haplótipos e a resposta ao tratamento com atorvastatina, expressão de RNAm ou atividade de CYP3A.

4. RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro*

As linhagens celulares HepG2 e Caco-2 foram tratadas com atorvastatina, sinvastatina e/ou ezetimiba e submetidas a experimentos para determinação das curvas de crescimento, tempo de dobramento celular, viabilidade, fragmentação do DNA e ciclo celular. Estes dados estão apresentados como **Apêndice 1** e foram publicados em artigos de nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 2009a; RODRIGUES *et al.*, 2009b; GENVIGIR *et al.*, 2010; CERDA *et al.*, 2011; GENVIGIR *et al.*, 2011).

4.1.1 Expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* nas linhagens celulares

O perfil de expressão de RNAm basal de *CYP3A4* e *CYP3A5* foi avaliado nas células HepG2 e Caco-2 (**Figura 8**) em relação aos genes de referência *GAPDH* e *HMBS*, respectivamente.

Na linhagem HepG2, o RNAm de *CYP3A4* foi 18 vezes mais expresso que o RNAm de *CYP3A5* ($p=0,0002$), enquanto na linhagem Caco-2 o RNAm de *CYP3A4* foi 47 vezes mais expresso em comparação com *CYP3A5* ($p=0,0111$). A expressão dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5* foi 31 vezes e 122 vezes maior, respectivamente, em Caco-2 que em HepG2 ($p<0,05$).

Figura 8. Perfil basal de expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* nas linhagens HepG2 e Caco-2.

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o gene de referência *GAPD* (HepG2) ou *HMBS* (Caco-2). Cada box representa a mediana com intervalo de 5 a 95%. A média está representada como (+) em cada box. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log. Valores de p calculados com teste t de Student.

4.1.2 Efeito da atorvastatina na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2

Foram realizados 4 experimentos independentes para análise do efeito da atorvastatina na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* após 6, 12 e 24 h. Os experimentos foram conduzidos utilizando concentração de atorvastatina até 20 μ M.

Em 6 h de tratamento, não se observou efeito da atorvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* ou *CYP3A5*, na linhagem HepG2. No entanto, a atorvastatina causou um aumento da expressão desses genes, em células HepG2 tratadas por 12 e 24 h (**Figura 9**). Após 12 h de tratamento, a expressão do RNAm de *CYP3A4* foi significativamente aumentada em 10 vezes com atorvastatina 20 μ M ($10,4 \pm 4,8$ versus $1,0 \pm 0,3$, $p=0,006$) (**Figura 9**). O aumento de expressão de *CYP3A4* foi observado também após tratamento de 24 h com 1 μ M ($5,7 \pm 0,9$), 10 μ M ($8,4 \pm 0,5$) e 20 μ M ($5,1 \pm 1,9$) comparado com o metanol ($1,0 \pm 0,3$), $p<0,001$. Para o *CYP3A5*, houve aumento da expressão no tratamento de 12 h com atorvastatina 20 μ M em

quase 5 vezes a concentração basal ($4,8 \pm 2,4$ versus $1,1 \pm 0,5$, $p < 0,001$). No entanto, o tratamento com atorvastatina durante 24 h não alterou a expressão de RNAm de *CYP3A5* independentemente da concentração usada ($p > 0,05$). (**Figura 9**).

Figura 9. Efeito da atorvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células HepG2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células HepG2 tratadas com atorvastatina (0,1 a 20 μM) e controle (0 μM). Valores (média $\pm$ DP, $n = 4$) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparadas com controle (0 μM) como indicado por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com atorvastatina não alterou a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* nas células Caco-2 tratadas com atorvastatina (0,1 a 20 μM), nos tempos 30, 60, 90 e 120 min (**Figura 10**) ($p > 0,05$). Estes resultados foram obtidos em 4 experimentos independentes.

Figura 10. Efeito da atorvastatina (após 30, 60, 90 e 120 min) na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*, em células Caco-2.

Nota: PCRq dos genes foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com atorvastatina (0,1 a 20 µM) e controle (0 µM) por 30-120 min. Valores (média ± DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Comparação com controle (0 µM) por Two-way ANOVA e pos-teste de Bonferroni.

Por sugestão de revisores de periódicos, decidiu-se testar concentrações mais baixas do fármaco (0,01 µM, 0,1 µM e 1 µM) durante períodos mais longos de tratamento (12 e 24 h). As concentrações de atorvastatina escolhidas para 12 e 24 h de tratamento não apresentaram citotoxicidade à linhagem Caco-2 (RODRIGUES *et al.*, 2009a).

Como se pode observar na **Figura 11**, a expressão de RNAm de *CYP3A4* e de *CYP3A5* manteve-se constante em relação aos controles nos tratamentos de 12h e 24h com atorvastatina em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$).

Figura 11. Efeito da atorvastatina (após 12 e 24 h) na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com atorvastatina (0,01 a 1 μM) e controle (0 μM). Valores (média ± DP, n = 3) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Variáveis comparadas com controle (0 μM) como indicado por *Two-way* ANOVA, e pós-teste de Bonferroni.

4.1.3 Efeito da sinvastatina na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2

Para avaliação dos efeitos da sinvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*, foram realizados 4 experimentos independentes com tempos de incubação de 6, 12 e 24 h (**Figura 12**). Os experimentos foram conduzidos utilizando as seguintes concentrações de sinvastatina: 0μM (veículo etanol), 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM e 10 μM. A expressão de RNAm de *CYP3A4* (**Figura 12**) apresentou um aumento de 2 vezes quando a concentração de 1,0 μM foi utilizada durante 24h ($2,3 \pm 1,7$ versus $1,0 \pm 0,1$ em 6 h de tratamento; $p < 0,01$). O aumento na expressão de *CYP3A4* não se sustentou quando a concentração de sinvastatina de 10 μM (concentração máxima testada) foi utilizada. A expressão de RNAm de *CYP3A5* foi aumentada (**Figura 12**) cerca de 4 vezes quando comparada ao controle ($1,2 \pm 0,2$), em 24 h de tratamento com sinvastatina nas concentrações de 0,1 μM ($2,7 \pm 0,4$, $p < 0,05$), 1 μM ($2,5 \pm 0,6$, $p < 0,01$) e 10 μM ($3,8 \pm 0,3$, $p < 0,01$).

Em Caco-2, foram realizados 4 experimentos independentes com tempos de incubação de 12 e 24 h (**Figura 13**). Os experimentos foram conduzidos utilizando as seguintes concentrações de sinvastatina: 0 μM (veículo etanol), 0,01 μM, 0,1 μM e 1 μM. Não foram observados efeitos de sinvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2.

Figura 12. Efeito da sinvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células HepG2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células HepG2 tratadas com sinvastatina (0,1 a 10 µM) e controle (0 µM). Valores (média ± DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. * p<0,05 ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparadas com controle (0 µM) como indicado por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 13. Efeito da sinvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com sinvastatina (0,01 a 1 µM) e controle (0 µM). Valores (média ± DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Análise por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.1.4 Efeito da ezetimiba na expressão de RNAm em células HepG2 e Caco-2

A fim de verificar se o efeito sobre a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* seriam reproduzidos em experimentos com outros hipolipemiantes foram realizados 4 experimentos independentes com ezetimiba, nos tempos de incubação de 12 e 24 h. Os experimentos foram conduzidos utilizando as seguintes concentrações de

ezetimiba: 0 μ M (veículo etanol), 0,5 μ M, 1,0 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M. Conforme esperado, a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* não foi alterada na presença da ezetimiba ($p>0,05$), (**Figura 14**), visto que este fármaco não é substrato de *CYP3A4* e *CYP3A5*.

Figura 14. Efeito da ezetimiba sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células HepG2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células HepG2 tratadas com ezetimiba (0,5 a 5 μ M) e controle (0 μ M). Valores (média $\pm$ DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Nós também avaliamos o efeito da ezetimiba (0,5 a 5 μ M) sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2 tratadas por 12 ou 24 h. Conforme demonstrado na **Figura 15**, esse tratamento não alterou a expressão do RNAm dos genes analisados ($p>0,05$).

Quando avaliamos a associação das duas classes de medicamentos (tratamento com ezetimiba + estatina), o tratamento com 2,5 ou 5,0 μ M de ezetimiba mais 1 μ M de sinvastatina por 24h também não alterou a expressão dos genes estudados na linhagem celular Caco-2, conforme apresentado na **Figura 16**.

Figura 15. Efeito da ezetimiba sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2.

Nota: PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com ezetimiba (0,5 a 5 µM) e controle (0 µM). Valores (média ± DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Figura 16. Efeito do tratamento com ezetimiba e sinvastatina sobre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em células Caco-2.

Nota: Sinva, sinvastatina; Eze, ezetimiba. PCRq foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com ezetimiba (2,5 e 5 µM) em combinação com sinvastatina (1 µM) e controle (0 µM). Valores (média ± DP, n = 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.1.5 Efeito de estatinas na expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* por *Western Blotting*

Para o estudo da expressão de proteínas *CYP3A4* e *CYP3A5* por *Western Blotting*, foi obtido o extrato de proteínas totais em tampão RIPA, de células HepG2 tratadas com atorvastatina (0,1 a 20 µM) ou sinvastatina (0,01 a 10 µM) por 12 ou 24 h.

Não observamos mudanças significantes no padrão de expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* nos tratamentos com atorvastatina ou sinvastatina, por 12 ou 24 h ($p > 0,05$) (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Efeito das estatinas sobre a expressão de proteína de *CYP3A4* em HepG2 após 12 e 24 h de tratamento. (A) atorvastatina, (B) simvastatina.

Nota: *Western Blotting* foi realizado a partir de 50ng de extrato total de proteínas em tampão RIPA das células HepG2 tratadas com atorvastatina (0,01 a 10 μM) e controle (0 μM). Análise por Two-way ANOVA (valor de p não significativo). Nos gráficos estão representados os valores (média ± DP, n = 4) de expressão normalizados em relação a β-actina, analisados utilizando o programa Image J. Radiografia da membrana de PVDF marcada com quimioluminescência.

Sabe-se que a técnica de *Western Blotting* não é tão sensível na detecção de proteínas quanto a técnica de PCRq para RNAm, e talvez isto tenha contribuído para os resultados encontrados. Por outro lado, é possível que as alterações na expressão de RNAm não reflitam em variabilidade na expressão das proteínas nessas células.

Figura 18. Efeito das estatinas sobre a expressão de proteína de CYP3A5 em HepG2 após 12 e 24 h de tratamento. (A) atorvastatina, (B) sinvastatina.

Nota: *Western Blotting* foi realizado a partir de 50ng de extrato total de proteínas em tampão RIPA das células HepG2 tratadas com atorvastatina (0,01 a 10 μM) e controle (0 μM). Análise por Two-way ANOVA (valor de p não significativo). Nos gráficos estão representados os valores (média ± DP, n = 4) de expressão normalizados em relação a β-actina, analisados utilizando o programa Image J. Radiografia da membrana de PVDF marcada com quimioluminescência.

4.1.6 Variantes de *CYP3A4* e *CYP3A5* nas linhagens celulares

As linhagens celulares HepG2 e Caco-2 foram genotipadas para as variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D*, uma vez que, em estudos já descritos na literatura e reproduzidos também por nosso grupo de pesquisa (KOCH *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2002; WILLRICH; HIRATA; HIRATA, 2009) verificou-se que variantes do *CYP3A5* podem afetar a expressão gênica. Os eletroferogramas das reações de sequenciamento são mostrados na **Figura 19**.

A linhagem HepG2 é portadora do haplótipo *CYP3A4*1A*/**1A* e *CYP3A5*1A*/**1A*, portanto não possui os alelos variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* ou *CYP3A5*1D*. A linhagem celular Caco-2 não possui a variante *CYP3A4*1B*, mas tem as variantes de *CYP3A5*3C* e **1D* em heterozigose.

Figura 19. Eletroferogramas dos ensaios de sequenciamento de HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F).

(A) Ausência da variante *CYP3A4*1B*. (B) Ausência da variante *CYP3A5*3C* (C) Ausência da variante *CYP3A5*1D*. (D) Ausência da variante *CYP3A4*1B*. (E) Heterozigose (F) Heterozigose

Após análise dos resultados de expressão de RNAm e de proteínas, compreendemos que o estudo das variantes não nos permite uma comparação fenotípica entre as linhagens celulares, como esperávamos. Por exemplo, poderíamos inferir que como HepG2 não possui variantes, apresentaria maior expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* que Caco-2, o que não aconteceu, pelas características e função de cada tipo celular. Pelo contrário, como vimos na **Figura 8**, Caco-2 expressa mais *CYP3A4* e *CYP3A5* do que HepG2, independentemente da presença de variantes.

A caracterização genotípica de linhagens celulares não é usual na literatura, no entanto, como a variante *CYP3A5*3C* é essencial para determinar o fenótipo de atividade de *CYP3A5*, entendemos que era importante determinar a presença da variante nas linhagens estudadas.

O genótipo *CYP3A5*3C* de HepG2 foi determinado anteriormente por Busi e Cresteil (2005). No entanto, os autores afirmaram que a linhagem celular *seria CYP3A5*3C/*3C*, genótipo diferente do encontrado por nosso grupo. HepG2 apresentou expressão de RNAm de *CYP3A5* na linhagem, o que é atribuído a presença de RNAm variantes, oriundos do processo de processamento (*splicing*) alternativo que ocorre na presença da variante. Nossos resultados foram confirmados em uma segunda reação de sequenciamento, e em nossa linhagem, de fato HepG2 não é portadora das variantes de *CYP3A5*.

Uma explicação para esta discrepância estaria no fato de que existem pelo menos duas cepas primárias de HepG2 (MARTIN *et al.*, 2008), e isso poderia explicar a diferença no genótipo encontrado por nosso grupo e Busi e Cresteil (2005).

Não há relatos do estudo das variantes de *CYP3A4* e *CYP3A5* em Caco-2. Essa linhagem apresenta *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* em heterozigose, portanto, assumindo o desequilíbrio de ligação entre os SNPs, tem uma cópia do alelo funcional de *CYP3A5*.

4.2 Estudos *in vivo*

Na **Tabela 7** são apresentados os dados dos indivíduos incluídos no estudo. O grupo NL e o grupo HC tinham a mesma distribuição de homens e mulheres ($p=0,843$), também de brancos e negros ($p=0,364$).

As médias de idade e de índice de massa corpórea (IMC), assim como percentual de obesidade foram maiores em pacientes HC quando comparados aos NL ($p<0,05$).

Indivíduos HC, quando comparados aos NL, também apresentaram maior proporção de mulheres após menopausa e maior histórico de DAC ($p<0,05$). Por outro lado, as distribuições de fumantes e a prática de exercício físico ($p>0,05$) foram similares entre os grupos.

O uso de medicações concomitantes como inibidores ou substratos de CYP3A foi similar entre o grupo NL e HC ($p>0,160$). 78% dos NL e 80% dos HC não faziam uso de medicamentos metabolizados por CYP3A4 e CYP3A5.

Como esperado, indivíduos HC apresentaram concentrações séricas de lipídeos superiores às do NL ($p<0,0001$), com exceção dos valores de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) que foram similares entre os grupos.

A frequência alélica das variantes estudadas está descrita na **Tabela 7** como *Minor Allele Frequency* (MAF).

Tabela 7. Características clínicas e concentrações de lipídeos séricos dos indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos (HC).

Variável	NL (99)	HC (139)	Valor de p
Gênero (masculino/feminino)	30/69	45/94	0,843 ^c
Idade (anos)	47 ± 8	57 ± 11	<0,0001 ^a
Etnia (brancos/Negros)	64/35	93/46	0,364 ^c
IMC (kg/m ²)	26 ± 4	28 ± 4	0,017 ^a
Obesidade (IMC > 30 kg/m ²) (%)	11	28	<0,0001 ^b
Hipertensão arterial (%)	48	58	0,091 ^c
História Familiar de DAC (%)	43	58	0,036 ^c
Prática de exercícios físicos (%)	51	46	0,566 ^c
Tabagismo (%)	17	22	0,469 ^c
Consumo de álcool (<7 doses/sem) (%)	30	31	1,000 ^c
Pós-menopausa (%)	32	85	<0,0001 ^c
Medicamentos concomitantes (%)			
Inibidores de CYP3A	14	8	0,160 ^c
Substratos de CYP3A	16	17	0,844 ^c
Nenhum	78	80	1,000 ^c
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	174 ± 18	281 ± 38	<0,0001 ^b
Triglicérides	91 ± 32	157 ± 64	<0,0001 ^b
HDL-c	56 ± 13	56 ± 14	0,883 ^b
LDL-c	100 ± 16	193 ± 35	<0,0001 ^b
VLDL-c	18 ± 6	32 ± 13	<0,0001 ^b
Apo AI	144 ± 28	130 ± 26	0,003 ^a
Apo B	75 ± 14	141 ± 22	<0,0001 ^a
Frequência alélica (Minor Allele Frequency – MAF)			
CYP3A4*1B rs2740574 [G]	0,33	0,20	0,149 ^c
CYP3A5*3C rs776746 [A]	0,33	0,29	0,538 ^c
CYP3A5*1D rs15524 [C]	0,30	0,26	0,367 ^c

Nota: Número de indivíduos em parênteses. HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t^(a) ou Mann-Whitney Rank Sum Test^(b). Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2) e Teste Exato de Fisher^(c).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP CYP3A4*1B: HC, $\chi^2 = 0,07$ ($p > 0,05$) e NL, $\chi^2 = 0,13$ ($p > 0,05$);

SNP CYP3A5*3C: HC, $\chi^2 = 1,32$ ($p > 0,05$) e NL, $\chi^2 = 3,36$ ($p > 0,05$);

SNP CYP3A5*1D: HC, $\chi^2 = 1,79$ ($p > 0,05$) e NL, $\chi^2 = 2,11$ ($p > 0,05$).

4.2.1 Resposta ao tratamento com atorvastatina

A eficácia do tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas) pode ser observada na **Tabela 8**. Os resultados do tratamento com atorvastatina após 4 semanas foi observada pela redução dos valores dos lipídeos plasmáticos. Houve redução significativa ($p < 0,0001$) das concentrações séricas de colesterol total, LDL-c e apoB após tratamento com atorvastatina. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de apoAI e HDL-c após os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 8. Perfil lipídico e outros parâmetros bioquímicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos HC (n=139), antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas).

Variável	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Variação (%)	Valor de p
Colesterol total (mg/dL)	281 ± 38	199 ± 31	-28,8 ± 9,5	<0,0001 ^b
Triglicérides (mg/dL)	157 ± 64	132 ± 52	-12,0 ± 27,3	0,002 ^b
HDL-c (mg/dL)	56 ± 13	54 ± 13	-2,5 ± 11,2	0,267 ^b
LDL-c (mg/dL)	193 ± 35	118 ± 28	-38,3 ± 12,2	0,0001 ^b
VLDL-c (mg/dL)	31 ± 12	26 ± 10	-12,0 ± 27,3	<0,0001 ^b
Apo AI (mg/dL)	130 ± 25	134 ± 26	-1,6 ± 13,9	0,304 ^a
Apo B (mg/dL)	140 ± 22	99 ± 20	-45,1 ± 26,7	<0,001 ^a
CK (U/L)	95 ± 78	94 ± 80	2,2 ± 35,3	0,627 ^b
ALT (U/L)	21 ± 9	24 ± 13	24,3 ± 59,4	0,072 ^b

Nota: Valores são apresentados como média ± DP dos dados. O sinal (-) indica redução. HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B, CK: creatina-quinase; ALT: alanina-transferase. Comparados por teste-t pareado^(a); teste Mann-Whitney^(b).

Após as 4 semanas de tratamento com atorvastatina, não foram verificados aumentos relevantes nos valores de CK (> 5 vezes o valor de referência superior (VRS) de 140 U/L para mulheres e 174 U/L para homens) ou ALT (> 2 vezes o valor de

referência superior de 36 U/L para mulheres e 43 U/L para homens). Como informação complementar, no grupo HC, 17 indivíduos apresentam CK basal maior que o VRS, sendo que o maior valor encontrado foi 359 U/L em uma mulher, o que equivale a 2,6 vezes o VSR. Após o tratamento, 23 indivíduos apresentaram CK maior que o VRS, sendo que o maior valor encontrado foi 495 U/L (3,5 vezes o VSR) em uma mulher cuja CK basal já era de 351 U/L.

Esses resultados são sugestivos de que na dose utilizada, a atorvastatina não promoveu reações adversas no período de avaliação do estudo, nos indivíduos que completaram as 4 semanas de tratamento. No entanto, vale lembrar que nossas análises contemplam somente os indivíduos que finalizaram o protocolo terapêutico de curta duração (4 semanas), e a dose de atorvastatina utilizada em nosso estudo é baixa (10 mg/dia). É de nosso conhecimento que queixas de mialgia intensa podem não ser acompanhadas de elevação de CK, e ainda assim justificar a interrupção do tratamento, no entanto em nossa casuística isto não ocorreu.

4.2.2 Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de RNAm em CMSP

O perfil de expressão gênica foi avaliado nas CMSP dos indivíduos pertencentes aos grupos NL (n=38) e HC (n=115). Como já previamente publicado (KUEHL *et al.*, 2001; KOCAREK *et al.*, 2002; ROUITS *et al.*, 2003; XIE *et al.*, 2004; SIEST *et al.*, 2005, NEUVONEN *et al.*, 2006, MANGRAVITE; KRAUSS, 2007, WANG *et al.*, 2011, LAMBA *et al.*, 2010), em nossas amostras há uma grande variabilidade interindividual na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*, com coeficientes de variação da ordem de 626% (6,3 vezes) para *CYP3A4* e 451% para *CYP3A5* (4,5 vezes). Este é o primeiro estudo a reportar a expressão de RNAm de *CYP3A5* em CMSP.

A expressão de RNAm de *CYP3A4* está fortemente correlacionada com a expressão de *CYP3A5*. Nos indivíduos HC, a correlação estudada através de análise de regressão linear (**Figura 20**) mostrou que as variáveis estão associadas antes ($R^2=0,22$, $p<0,0001$) e após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas ($R^2=0,58$, $p<0,0001$).

Figura 20. Correlação entre a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após o tratamento com atorvastatina.

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; A associação entre as variáveis foi analisada através de regressão linear. RNAm, RNA mensageiro. A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o controle endógeno *GAPDH*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ (n=115).

Nos grupos NL e HC, a expressão basal de transcritos de *CYP3A4* foi cerca de 2,5 a 9,6 vezes superior à expressão de *CYP3A5* (**Figura 21**, $p < 0,0001$), respectivamente.

A expressão de *CYP3A4* e de *CYP3A5* foi maior no grupo NL quando comparada à expressão no grupo HC ($p = 0,0043$ para *CYP3A4* e $p = 0,0150$ para *CYP3A5*).

O tratamento com atorvastatina não modificou a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP de forma significativa ($p > 0,05$), como pode ser observado na **Figura 22**. A grande variabilidade interindividual na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* pode ter contribuído para os resultados encontrados.

Poderíamos supor que a hipercolesterolemia inibe a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5*, no entanto, após o tratamento com atorvastatina, quando os valores de colesterol total e LDL-c diminuem, não observamos aumento de expressão de RNAm nos indivíduos HC. Então analisamos o perfil de expressão de RNAm somente dos indivíduos HC que atingiram LDL-c (inferior a 100 mg/dL) após o tratamento (dados não mostrados). A expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* deste grupo de pacientes

não foi diferente da expressão observada nos demais indivíduos ($p>0,05$, dados não mostrados).

A fim de explicar este achado, realizamos análise de regressão linear univariada usando a expressão de RNAm de CYP3A4 após atorvastatina como variável dependente (dados não mostrados). Os resultados desta análise indicam que a expressão de CYP3A4 diminui com o aumento da idade ($p<0,0001$) e a menopausa ($p=0,024$) (mais prevalentes no grupo HC, conforme a **Tabela 7**), e também está inversamente associada aos valores basais de colesterol total, LDL-c e triglicérides ($p<0,0001$). O mesmo aconteceu quando a expressão de RNAm de CYP3A5 após o tratamento foi usada como variável dependente (dados não mostrados, $p<0,05$).

Figura 21. Perfil de expressão de RNAm basal dos genes estudados em CMSP.

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC, Indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina (n=115); HC-SE, indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina e/ou ezetimiba (n=18); NL, indivíduos normolipidêmicos (n=11); RNAm, RNA mensageiro. A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o controle endógeno *GAPD*. Número de indivíduos entre parênteses. Cada box representa a mediana com intervalo de 5 a 95%. *Outliers* estão representados como pontos no gráfico. A média está representada como (+) em cada box. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log. Valores de p calculados com teste-t. ** $p=0,0043$. * $p=0,0150$.

Figura 22. Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão de RNAm em CMSP.

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC, Indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina (n=115); RNAm, RNA mensageiro; Basal, expressão pré-tratamento com atorvastatina; A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o controle endógeno *GAPD*. Cada *box* representa a mediana com intervalo de 5 a 95%. *Outliers* estão representados como pontos no gráfico. A média está representada como (+) em cada *box*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log. Valores de p calculados com o *Wilcoxon Signed Rank Test*.

4.2.3 Efeito de hipolipemiantes sobre a atividade de CYP3A

As CYP3A4 e CYP3A5 tem uma grande sobreposição de substratos (XIE *et al.*, 2004), inibidores e indutores, portanto é difícil isolar a contribuição individual de cada enzima em termos fenotípicos. Para análise da atividade de CYP3A utilizamos a avaliação da biotransformação de cortisol a 6 β OHC.

Na **Figura 23**, são apresentados os valores de atividade encontrados no grupo HC, (n=122), antes e após o tratamento, e grupo NL (n=65). Os indivíduos NL apresentam uma mediana maior (1,484, IC 95%: 1,356-1,697) quando comparados aos indivíduos HC (0,910, IC 95%: 0,7842-1,064; p<0,0001). Ao analisar o efeito do tratamento com atorvastatina, nota-se que os valores da atividade de CYP3A após o tratamento permanecem similares aos valores basais (p=0,2216).

Figura 23. Avaliação da atividade de CYP3A através da razão 6βhidróxicortisol/cortisol em amostras de urina.

Nota: NL, indivíduos normolipidêmicos (n=65); HC, indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina (n=122). Número de indivíduos entre parênteses. Cada box representa a mediana com intervalo de 5 a 95%. *Outliers* estão representados como pontos no gráfico. A média está representada como (+) em cada box. Valores calculados a partir da razão [6βOHC/cortisol]. Valores no eixo Y em escala log. HC bas e Ava comparados através do teste t de Student pareado. NL versus HC basal ou HC Atorvastatina através de Teste-t de Student. *** p<0,0001.

4.2.4 Haplótipos, resposta farmacológica e expressão gênica

As variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* foram estudadas. A frequência das variantes na população de nosso estudo foi estudada e publicada anteriormente (WILLRICH *et al.*, 2008; CAVALLI *et al.*, 2008) e portanto estudá-las individualmente não foi objeto do estudo atual. No entanto, é importante frisar que as frequências dos alelos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e são similares às frequências encontradas em outras populações caucasianas e afro-descendentes (XIE *et al.*, 2004; NCBI SNP database, 2011).

A frequência das variantes estudadas foi similar entre HC e NL (p>0,05; **Tabela 7**) e diferente entre brancos e negros (p<0,0001, dados não mostrados) na população de nosso estudo (WILLRICH *et al.*, 2008; CAVALLI *et al.*, 2008).

As variantes *CYP3A4*1B* e *CYP3A5*3C* estão em desequilíbrio de ligação (WOJNOWSKI *et al.*, 2002) e esta forte associação foi reproduzida em nosso estudo

(Figura 24), índice $D' = 0,7202$ ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,37$). Uma associação ainda mais forte foi encontrada para CYP3A5*3C e CYP3A5*1D, $D' = 0,9136$ ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,73$).

Figura 24. Análise de Desequilíbrio de Ligação entre as variantes estudadas em indivíduos HC e e NL.

Nota: Figura gerada através do sistema de informática Haploview versão 4.2.

Em uma análise prévia (WILLRICH *et al.*, 2010), havíamos analisado o efeito das variantes agrupando os indivíduos em “grupos funcionais”. Isto é, os grupos foram formados tomando como base as informações descritas para cada variante na literatura (CAVALLI; HIRATA; HIRATA, 2001; BALRAM *et al.*, 2003; XIE *et al.*, 2004). No grupo 1, foram incluídos os portadores da CYP3A4 funcional (CYP3A4*1A); no grupo 2, foram incluídos os portadores da CYP3A5 funcional (CYP3A5*1A); e, no grupo 3, foram alocados os indivíduos com as duas enzimas funcionais. No entanto, com esta análise não foi possível observar associação entre a resposta lipídica, a expressão de RNAm ou a atividade de CYP3A com as variantes estudadas ($p > 0,05$). A expressão de RNAm ou a atividade de CYP3A basais entre os grupos funcionais também foi similar ($p > 0,05$).

A partir de então, decidiu-se estudar o efeito das variantes com base na frequência dos grupos haplotípicos, isto é, a combinação aleatória dos genótipos encontrados. Consideramos como referência o haplótipo AGT (alelos incluídos na seguinte ordem: *CYP3A4**1B (A>G); *CYP3A5**3C (A>G) e *CYP3A5**1D (C>I), que embora contenha as variantes de *CYP3A5* (*CYP3A5**3C e *CYP3A5**1D) é o mais frequente na nossa população. Na **Tabela 9**, estão apresentados as frequências dos grupos haplotípicos encontrados em nosso estudo nos indivíduos NL e HC. A frequência dos haplótipos foi similar entre NL e HC.

Os haplótipos foram associados com etnia dos indivíduos, assim como aconteceu com a análise dos genótipos individualmente ($p < 0,0001$, **Tabela 10**). No entanto, apesar da forte associação, optamos por não distribuir os indivíduos de acordo com sua etnia, uma vez que a cor da pele não reflete a ancestralidade da população brasileira (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2009).

Tabela 9. Frequências dos grupos haplotípicos formados pelas variantes *CYP3A4**1B, *CYP3A5**3C e *CYP3A5**1D, em indivíduos NL e HC.

Polimorfismos					
<i>CYP3A4</i> *1B (A>G)	<i>CYP3A5</i> *3C (A>G)	<i>CYP3A5</i> *1D (C>T)	NL (n=128)	HC (n=242)	<i>p</i> value
A	G	T	0,56481 (73)	0,6694 (162)	0,1460
G	A	C	0,21865 (28)	0,1364 (33)	0,1972
A	A	C	0,08764 (11)	0,1116 (27)	0,3678
G	A	T	0,02308 (3)	0,0455 (11)	0,2757
G	G	T	0,06456 (8)	0,0207 (5)	0,2790
A	G	C	0,02448 (3)	0,0124 (3)	0,2934
A	A	T	0,01678 (2)	0,0040 (1)	0,2932

Nota: Número de indivíduos entre parêntesis. Variáveis comparadas através do teste Exato de Fisher.

Tabela 10. Regressão logística univariada dos haplótipos formados pelas variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* com características clínicas dos indivíduos HC e NL.

Variáveis	HC		NL	
Características clínicas	Hap-Score	Valor de p	Hap-Score	Valor de p
História familiar de DAC (0=não, 1=sim)		0,071		0,44939
AAC	-1,58522	0,603	-1,63924	0,091
GAC	-0,95632	0,052	-0,80345	0,434
GAT	-0,77854	0,038	-0,68970	0,514
GGT	-0,20322	0,240	-0,25911	0,817
AGT	1,92140	0,547	1,78893	0,063
Hipertensão (0=não, 1=sim)		0,444		0,2472
AAC	-0,33458	0,297	-0,25144	0,297
GAC	1,42003	0,395	1,66094	0,395
GAT	-0,6214	0,130	-0,5056	0,130
GGT	0,4150	0,913	0,3230	0,913
AGT	-1,88547	0,363	-1,66949	0,363
Etnia (1=Caucasiana, 0=Outra)		< 0,0001		< 0,0001
AAC	-1,95863	0,012	-1,69309	0,09055
GAC	-5,21164	0,000000008	-5,07735	0,000000008
GAT	-4,31586	0,0004	-	-
GGT	-1,69452	0,061	-1,70489	0,0876
AGT	6,09247	0,677	6,18023	<0,0001
Sexo (0=feminino, 1=masculino)		0,539		0,62955
AAC	0,18470	0,397	0,12440	0,911
GAC	0,14367	0,715	0,15209	0,868
GAT	0,31586	0,283	0,42112	0,730
GGT	0,60123	0,504	0,52615	0,613
AGT	0,05274	0,246	0,06688	0,957

Nota: A análise dos haplótipos foi realizada com o programa de informática HaploStats. Valores de p em negrito referem-se a associação de todas as variáveis (*overall association*). Os demais são provenientes de análises do haplótipo descrito versus o haplótipo de referência (definido por AGT). Para esta análise somente grupos haplotípicos com n > ou igual a 5 foram incluídos.

A seguir, fizemos uma análise de regressão linear univariada para avaliar o efeito dos haplótipos sobre a resposta lipídica, expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* e atividade de CYP3A nos indivíduos HC e NL. Os resultados estão apresentados em detalhe na **Tabela 11** e os resultados mais relevantes são apresentados na forma de figuras.

A resposta lipídica ao tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas não foi associada com os haplótipos nos indivíduos HC. Na **Figura 25** estão ilustrados o efeito dos haplótipos nos valores de colesterol total (**Figura 25A**) e LDL-c (**Figura 25B**) após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas. A variação absoluta (delta, mg/dL) ou relativa (%) do colesterol total e LDL-c, assim como a variação (%) do HDL-c, Triglicérides, ApoA1 e ApoB não foram associadas com os grupos haplotípicos, ($p>0,05$, **Tabela 10**).

Figura 25. Efeito dos haplótipos na resposta ao tratamento com atorvastatina 10mg/dia 4 semanas.

Nota: A análise dos haplótipos foi realizada com o programa de informática HaploStats. A resposta ao tratamento foi avaliada pelos valores absolutos de colesterol total (A) e LDL-c (B) após o tratamento, bem como pela variação absoluta (delta, mg/dL) e relativa (%) do colesterol total e LDL-c após o tratamento (figuras não mostradas). A mediana para cada haplótipo está representada como um hífen (-) no gráfico. Os indivíduos portadores dos haplótipos raros (*rare* = AAT e AGC) foram agrupados. Cada indivíduo HC é portador de dois haplótipos, por isso há dois pontos no gráfico para cada HC. O valor global de p encontrado nesta análise para o colesterol total foi $p=0,309$, e para o LDL-c $p=0,688$.

Os indivíduos HC portadores dos grupos haplotípicos GAC, AAT e AGC apresentaram valores de CK mais elevados após o tratamento quando comparados aos

indivíduos portadores do haplótipo AGT (referência), e os portadores do haplótipo GGT, por sua vez, apresentaram menor atividade da enzima ($p=0,022$), **Figura 26**.

A expressão basal de RNAm de *CYP3A4* não está associada com os grupos haplotípicos nos indivíduos HC e NL ($p=0,252$), dados apresentados na **Figura 27A**. Quando somente os HC são avaliados, o valor de $p=0,887$ foi encontrado. Para os indivíduos NL avaliados isoladamente, $p=0,939$ (**Tabela 11**).

Figura 26. Efeito dos haplótipos nos valores de CK após tratamento.

Nota: A análise dos haplótipos foi realizada com o programa de informática HaploStats. O aparecimento de efeitos adversos foi monitorado pelos valores de ALT (marcador de hepatotoxicidade, dados não mostrados) CK (marcador de miotoxicidade) após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas. A mediana para cada haplótipo está representada como um hífen (-) no gráfico. Os indivíduos portadores dos haplótipos raros (*rare* = AAT e AGC) foram agrupados. Cada indivíduo HC é portador de dois haplótipos, por isso há dois pontos no gráfico para cada HC. O valor de p para a associação dos haplótipos com CK $p=0,022$ (*), pós-testes: GAC vs AGT, $p=0,033$; GGT vs AGT, $p<0,0001$; Raros vs AGT $p<0,0001$.

No entanto, níveis mais elevados de expressão de RNAm de *CYP3A5* foram associados com os haplótipos GAC ($p=0,0008$) e GAT ($p=0,037$), quando comparados com o haplótipo referência AGT em indivíduos NL e HC analisados em conjunto. Este

achado confirma o efeito deletério da variante *CYP3A5*3C* (A>G) para *CYP3A5*, dados apresentados na **Figura 27B**. O efeito global da associação avaliado somente nos indivíduos HC perde força estatística, com valor de $p=0,094$, embora os haplótipos GAC e GAT permaneçam significantes ($p=0,045$ e $p=0,0003$, respectivamente, vide **Tabela 10**). Nos indivíduos NL avaliados isoladamente, $p=0,966$ (**Tabela 10**).

Figura 27. Efeito dos haplótipos na expressão basal de RNAm de *CYP3A4* (A) e *CYP3A5* (B) nos indivíduos HC e NL.

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o controle endógeno *GAPD*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log. A mediana para cada haplótipo está representada como um hífen (-) no gráfico. A análise dos haplótipos foi realizada com o programa HaploStats. Os indivíduos portadores dos haplótipos raros (AAT e AGC) foram agrupados. Cada indivíduo é portador de dois haplótipos, por isso há dois pontos no gráfico para cada indivíduo. O valor de p para a associação dos haplótipos com expressão basal de RNAm de *CYP3A4* foi $p=0,252$ (não significativo) e para *CYP3A5* $p=0,024$ (*), pós-testes: GAC vs AGT, $p=0,008$; GAT vs AGT, $p=0,037$.

A expressão de RNAm de *CYP3A4* basal e pós-tratamento com atorvastatina não foi associada com os grupos haplotípicos (**Figura 28A**). A expressão de RNAm de *CYP3A5*, contudo, que foi associada com os haplótipos GAC e GAT antes do tratamento, desaparece após atorvastatina ($p=0,919$, **Figura 28B**). A variação na expressão de RNAm de *CYP3A4* ou *CYP3A5* também não foi associada aos grupos haplotípicos ($p>0,05$, **Tabela 11**).

A atividade de *CYP3A*, avaliada através da razão $6\beta\text{OHC/cortisol}$ em amostras de urina, não foi relacionada com os grupos haplotípicos nos indivíduos HC e NL antes

do tratamento com atorvastatina (basal, $p=0,307$) ou após, para os indivíduos HC ($p=0,714$), **Figura 29**. Contudo, os haplótipos raros (AAT e AGC combinados) apresentaram menor atividade de CYP3A ($p < 0,0001$), quando comparados com o haplótipo AGT (referência) após o tratamento. Como são haplótipos raros, e portanto de baixa frequência na população, isto pode ter contribuído para os resultados encontrados. A variação da atividade de CYP3A (delta da razão $6\beta\text{OHC/cortisol}$) também não foi associada aos grupos haplotípicos ($p=0,223$).

Figura 28. Efeito dos haplótipos na expressão de RNAm de *CYP3A4* (A) e *CYP3A5* (B) nos indivíduos HC após atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Nota: A análise dos haplótipos foi realizada com o programa de informática HaploStats. A expressão de RNAm de cada gene foi medida por PCRq e normalizada com o controle endógeno *GAPD*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta\text{CT}}$. Valores no eixo Y em escala log. A mediana para cada haplótipo está representada como um hífen (-) no gráfico. Os indivíduos portadores dos haplótipos raros (*rare* = AAT e AGC) foram agrupados. Cada indivíduo é portador de dois haplótipos, por isso há dois pontos no gráfico para cada indivíduo. O valor global de p para a associação dos haplótipos com expressão de RNAm de *CYP3A4* foi $p=0,373$ e para *CYP3A5* $p=0,919$ (não significante).

Figura 29. Efeito dos haplótipos na atividade de CYP3A nos indivíduos HC após atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Nota: A análise dos haplótipos foi realizada com o programa de informática HaploStats. A atividade de CYP3A foi analisada através da razão de 6βOHc/cortisol em amostras de urina por CLAE. Valores no eixo Y em escala log. A mediana para cada haplótipo está representada como um hífen (-) no gráfico. Os indivíduos portadores dos haplótipos raros (*rare* = AAT e AGC) foram agrupados. Cada indivíduo é portador de dois haplótipos, por isso há dois pontos no gráfico para cada indivíduo. O valor global de p para a associação dos haplótipos com a atividade de CYP3A foi $p=0,714$ (não significativa).

Tabela 11. Análise de regressão linear univariada dos haplótipos dos indivíduos HC com perfil lipídico, expressão de RNAm de CYP3A4 e CYP3A5 e a atividade de CYP3A, antes e após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Variáveis Dependentes	Basal		Após Atorvastatina		Variação (%)	
	Hap-Score	Valor de p	Hap-Score	Valor de p	Hap-Score	Valor de p
Perfil Lipídico						
Colesterol total (mg/dL)	8,761	0,175	7,104	0,309	4,112	0,577
AAC		0,641		0,776		0,444
GAC		0,140		0,147		0,776
GAT		0,138		0,194		0,909
GGT		0,255		0,842		0,304
AAT, AGC, GGC		0,827		0,173		0,169
LDL-c (mg/dL)	8,063	0,258	3,637	0,688	3,968	0,608
AAC		0,648		0,506		0,346
GAC		0,235		0,477		0,871
GAT		0,410		0,390		0,850
GGT		0,329		0,494		0,022
AAT, AGC, GGC		0,974		0,435		0,362
HDL-c (mg/dL)	7,692	0,259	7,389	0,289	6,556	0,359
AAC		0,013		0,061		0,096
GAC		0,728		0,858		0,133
GAT		0,093		0,169		0,404
GGT		0,592		0,262		0,219
AAT, AGC, GGC		0,816		0,534		0,388
Triglicérides (mg/dL)	8,077	0,210	11,049	0,105	4,628	0,526
AAC		0,020		0,072		0,555
GAC		0,215		0,038		0,334
GAT		0,950		0,694		0,454
GGT		0,976		0,762		0,693
AAT, AGC, GGC		0,672		0,210		0,288
ApoA1 (mg/dL)	3,073	0,743	6,121	0,383	9,648	0,158
AAC		0,237		0,164		0,719
GAC		0,677		0,899		0,700
GAT		0,557		0,280		0,562
GGT		0,973		0,900		0,991
AAT, AGC, GGC		0,972		0,273		0,128
ApoB (mg/dL)	5,774	0,403	15,172	0,033	8,644	0,189
AAC		0,472		0,512		0,913
GAC		0,288		0,014		0,084
GAT		0,142		0,663		0,652
GGT		0,831		0,120		0,046
AAT, AGC, GGC		0,454		0,097		0,299
Marcadores de Efeitos Adversos						
CK (U/L)	18,596	0,019	16,240	0,022	11,798	0,108
AAC		0,391		0,378		0,718
GAC		0,003		0,033		0,230
GAT		0,585		0,734		0,965
GGT		0,059		0,00004		0,033
AAT, AGC, GGC		0,002		< 0,00001		0,320
ALT (U/L)	19,763	0,010	7,101	0,325	9,064	0,205
AAC		0,0259		0,371		0,691
GAC		0,260		0,504		0,470

GAT	0,354	0,239	0,523
GGT	0,467	0,110	0,609
AAT, AGC, GGC	0,009	0,526	0,279
Expressão do RNAm	(2^{-ΔCt})	(2^{-ΔCt})	(2^{-ΔΔCt})
Expressão de CYP3A4	0,887	0,373	0,479
AAC	0,521	0,656	0,656
GAC	0,084	0,409	0,409
GAT	0,808	0,614	0,614
GGT	0,851	0,688	0,688
AAT, AGC, GGC	0,722	0,753	0,753
Expressão de CYP3A5	0,094	0,919	0,375
AAC	0,915	0,469	0,862
GAC	0,045	0,511	0,260
GAT	0,0003	0,629	0,444
GGT	0,451	0,759	0,638
AAT, AGC, GGC	0,902	0,823	0,920
Atividade de CYP3A			Delta
Razão 6βOHC/Cortisol	0,731	0,714	0,223
AAC	0,667	0,538	0,592
GAC	0,336	0,419	0,926
GAT	0,461	0,280	0,887
GGT	-	0,862	0,143
AAT, AGC, GGC	0,440	< 0,0001	0,052

Nota: Valores de p em negrito referem-se a associação de todas as variáveis (*overall association*). Os demais são provenientes de análises pareadas do haplótipo descrito versus o haplótipo de referência (definido por AGT). AAT, GGC e AGC foram agrupados por serem haplótipos raros, com baixa ocorrência na população

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo evidenciaram o efeito de estatinas e da ezetimiba na expressão das enzimas de biotransformação CYP3A4 e CYP3A5. Os resultados estão discutidos de acordo com os experimentos *in vitro*, com as linhagens celulares HepG2 e Caco-2 tratadas com atorvastatina ou sinvastatina ou ainda com sinvastatina e/ou ezetimiba e *in vivo*, em pacientes NL e HC tratados com atorvastatina.

5.1 Estudos *in vitro*

A expressão de CYP3A4 e de CYP3A5 foi maior em Caco-2 que em HepG2. Este achado está em acordo com o trabalho de Martin e colaboradores (2008), que estudaram o perfil de indução de transportadores de membrana e várias CYPs, em linhagens celulares intestinais e hepáticas, e notaram que a expressão basal de RNAm de CYP3A4, CYP3A5 e CYP2B6 era maior de acordo com a sequência a seguir: hepatócitos primários > Caco-2 > HepG2.

Esta diferença de conteúdo de RNAm pode ser constitutiva, inerente a cada tipo celular. Ou ainda, a vitamina D presente no soro fetal bovino utilizado como suplemento no meio de cultura é um conhecido indutor de CYP3A4 e CYP3A5 em Caco-2 (WANG *et al.*, 2008), e isso poderia explicar a maior expressão basal de Caco-2 em comparação a HepG2.

Sabe-se que a expressão de CYP3A4 e CYP3A5 são reguladas por vários fatores fatores de transcrição, sendo já descritos: PXR (XIE *et al.*, 2004), CAR (KOBAYASHI *et al.*, 2005), VDR (WANG *et al.*, 2008) e RXR α (WANG *et al.*, 2008). No entanto, estes fatores de transcrição são diferentemente expressos nas linhagens celulares estudadas. A. Em Caco-2, o VDR é o principal receptor nuclear presente (WANG *et al.*, 2008), e a linhagem expressa quantidades indetectáveis de PXR e CAR (HABANO *et al.*, 2011; THUMMEL *et al.*, 2001). Já HepG2 não possui VDR, e nesta linhagem PXR e CAR são os principais fatores de transcrição disponíveis. Os diferentes fatores de

transcrição presentes nas células, bem como sua disponibilidade promovem efeitos diferentes sobre os genes regulados por eles.

Ainda, a presença de micro-RNAs, que regulam a expressão pós transcrição de genes alvo na extremidade 3'UTR e tem um perfil de expressão característico em cada tipo celular, podem inibir a tradução e/ou clivar o RNAm, reduzindo a expressão do gene alvo (PAN; GAO; YU, 2009).

Em nosso estudo, as estatinas aumentaram a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* HepG2, mas não em Caco-2.

O tratamento das células HepG2 com atorvastatina aumentou a expressão de *CYP3A4* em até 10 vezes. Para *CYP3A5*, houve aumento da expressão mais de 4 vezes a concentração basal. A sinvastatina elevou a expressão de RNAm de *CYP3A4* em cerca de 2 vezes. A expressão de RNAm de *CYP3A5* foi cerca de 4 vezes. Contudo, o pico de aumento não se deu com a concentração máxima testada dos fármacos (20 µM para atorvastatina e 10 µM para sinvastatina). Resultado semelhante foi encontrado por Martin e colaboradores (2008), ao analisar o perfil de indução da expressão de RNAm de *CYP3A4* e do transportador de efluxo ABCB1, em HepG2 tratadas com pregnelona- α -carbonitrila (PCN), um ativador de receptores nucleares. As concentrações de PCN testadas e não tóxicas foram de 0,01 a 100 µM. Os autores notaram que doses submáximas de PCN (0,1 µM) produziam o maior pico de expressão de *CYP3A4* e *ABCB1* em relação aos controles sem PCN. A hipótese dos autores para tal fato é de que em altas concentrações, a ativação de outros sistemas poderia resultar em repressão ou antagonismo parcial.

A expressão dos transcritos de *CYP3A4* e *CYP3A5* não se alterou em células HepG2 tratadas com ezetimiba. A inclusão deste hipolipemiante no estudo teve o objetivo de entender se os efeitos observados na expressão e atividade de *CYP3A4* e *CYP3A5* são dependentes de estatinas ou dependentes de redução do colesterol. Nossos resultados sugerem que as estatinas testadas, mas não a ezetimiba, modulam a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* *in vitro* em HepG2.

Em Caco-2, a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* não foi alterada pelo tratamento com ambos os fármacos ($p>0,05$).

Nossos resultados são sugestivos de que HepG2 é mais indutível que Caco-2, que não respondeu aos tratamentos. Em estudo publicado anteriormente (MARTIN *et al.*, 2008) com as linhagens celulares Caco-2 e HepG2, o perfil de indução com compostos como fenobarbital, rifampicina e PCN era diferente entre as células: a linhagem mais indutível era HepG2, seguida de Caco-2 e por último os hepatócitos primários (MARTIN *et al.*, 2008).

Já a expressão constante de CYP3A4 e CYP3A5 em Caco-2 poderia ser explicada em parte, pela maior expressão basal destes transcritos na linhagem celular Caco-2 em comparação com HepG2.

Recentemente, QIU e colaboradores (2010) sugeriram que a maior contribuinte para a grande variabilidade intraindividual de CYP3A4 não são suas variantes genéticas, e sim a complexidade singular de sua região promotora, que é sensível a inúmeros ligantes endógenos e exógenos de receptores nucleares.

A atorvastatina e a lovastatina são ligantes de PXR e CAR (LEHMAN *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Embora não haja relatos sobre a sinvastatina, é provável, por sua similaridade estrutural com as demais, que também seja um ligante para estes receptores nucleares. Foi demonstrado que os indutores ligam-se diretamente ao PXR e o complexo se liga a sequências específicas (motivos) na região promotora (5'UTR) de genes da família CYP3A (BURK; WOJNOWSKI, 2004). Há relatos controversos se as estatinas são ligantes de VDR, fator de transcrição presente em Caco-2 (GRIMES *et al.*, 2006; MARSHALL *et al.*, 2006). Especula-se que somente a sinvastatina seria um ligante parcial (MARSHALL *et al.*, 2006) de VDR, e isso poderia ter explicar o fato de as estatinas testadas não terem afetado a expressão de CYP3A4 e CYP3A5 em Caco-2.

Foi descrito que HepG2 não expressa uma co-chaperona, a proteína responsável por reter o receptor constitutivo de androstano (CAR) no citosol, resultando em um acúmulo nuclear de CAR (KOBAYASHI *et al.*, 2005), e isso poderia contribuir para a maior indução de HepG2 em nossos achados, pois as estatinas são ligantes de PXR e CAR, que regulam a expressão de CYP3A4 e CYP3A5 em HepG2.

Takagi e colaboradores (2008) observaram que o PXR tem um papel pós-transcricional de regulação da expressão de CYP3A4. Os autores relatam que o micro-

RNA miR-148a afeta negativamente a expressão da proteína PXR: quanto maior a expressão de miR-148a, menor a eficiência de PXR. Essas variações dependentes do micro-RNA afetaram a indução de *CYP3A4* em células LS180 (TAKAGI *et al.*, 2008).

Martin e colaboradores (2008), ao estudar o perfil de indução de *CYP3A5* em Caco-2 e hepatócitos primários, relataram que não houve mudança significativa no perfil de RNAm após tratamento com fenobarbital, diferentemente de *CYP3A4*, onde um aumento na quantidade de RNAm foi observado.

O PXR é ativado quando forma um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor X retinóide (RXR). A associação entre o heterodímero PXR-RXR e o ligante (xenobiótico) ativa a transcrição de genes envolvidos na biotransformação e eliminação de fármacos, protegendo as células de ações tóxicas do excesso de xenobiótico ou de seus metabólitos (KLEWER, 2003). Outro estudo, de Wang e colaboradores (2008), mostra que retinóides ativam outros receptores nucleares, os heterodímeros de RXR-VDR (*Retinoid X Receptors e Vitamin D Receptors*) em *trans*, e também os homodímeros RXR-RXR e isso induz a expressão de RNAm de *CYP3A4*, assim como a atividade da enzima (WANG *et al.*, 2008).

Sabe-se que *CYP3A5* é menos indutível que *CYP3A4* por conta de diferenças em suas regiões promotoras (XIE *et al.*, 2004; WILLRICH, HIRATA, HIRATA, 2009). *CYP3A4* é mais indutível que *CYP3A5*, e em parte isto pode dever-se ao fato de que a região promotora de *CYP3A5* contém somente um elemento responsivo – PXRE - para ligação com o heterodímero ativado de receptores nucleares (PXR-RXR -estatina). Enquanto isso, *CYP3A4* possui dois sítios de ligação (PXRE e XREM). Isso poderia explicar a maior indução de *CYP3A4* frente a xenobióticos quando comparada com *CYP3A5*, como ilustrado na **Figura 30** (WILLRICH; HIRATA; HIRATA, 2009). Ainda, a região promotora do *CYP3A5* tem pouca similaridade com as 5'UTRs dos genes *CYP3A4* e de *CYP3A7*, e apresenta 89,6% de homologia com a região promotora do pseudogene *CYP3AP1* (XIE *et al.* 2004 ; BURK; WOJNOUNSKI, 2004).

A análise das proteínas de *CYP3A4* e *CYP3A5* por *Western Blotting* não detectou variações significantes no padrão de expressão após tratamento com as duas estatinas testadas ($p>0,05$). Não encontramos correlação linear entre o perfil de expressão de RNAm e proteína para *CYP3A4* ou *CYP3A5* em células HepG2 nos experimentos

realizados. Esse resultado contrasta com estudos *in vitro* que apontam forte correlação entre os valores de RNAm e proteína de *CYP3A4* em hepatócitos (WATANABE *et al.*, 2004; TAKAGI *et al.*, 2008).

Sabe-se que a técnica de *Western Blotting* não é tão sensível quanto a técnica de PCRq, e isso pode ter contribuído para os resultados encontrados. Outro ponto importante a ser considerado é a alta semelhança entre as proteínas *CYP3A4* e *CYP3A5*. Os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* têm 13 éxons e codificam uma proteína de 503 e 502 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Como ambas tem aproximadamente 50-57 kDa e a sequência de aminoácidos de *CYP3A5* tem 85% de similaridade com a *CYP3A4* (FUKUEN *et al.*, 2002), é possível que os resultados encontrados pelos ensaios de *Western Blotting* reflitam a presença das duas proteínas simultaneamente. Ainda, podem haver modificações pós-transcrição (ligação com fatores de transcrição, degradação e instabilidade do RNAm) e pós-tradução (como fosforilação) importantes em *CYP3A4* e *CYP3A5* que afetem o processo de tradução e síntese protéica.

A genotipagem das linhagens celulares deste estudo por sequenciamento revelou que HepG2 não possui as variantes estudadas, e possivelmente a linhagem utilizada em nosso estudo é de origem diferente da linhagem estudada por Busi e Cresteil (2005), que encontraram genótipo distinto (*3/*3) para a variante *CYP3A5*3C*. Foi descrito que existem pelo menos duas cepas primárias de HepG2 (MARTIN *et al.*, 2008). O grupo haplotípico encontrado em nosso estudo na linhagem HepG2 (AAC) codifica as proteínas funcionais de *CYP3A4* e *CYP3A5*, e é corroborado pelo aumento da expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* após o tratamento com estatinas, o que não faria sentido se HepG2 tivesse as variantes não funcionais de *CYP3A5* descritas por Busi e Cresteil (2005).

A linhagem celular Caco-2 não possui a variante *CYP3A4*1B*, mas tem as variantes de *CYP3A5*3C* e **1D* em heterozigose (haplótipos AGT e AAC). Ainda, se considerarmos que a presença das variantes de *CYP3A5* em heterozigose em Caco-2 estão em *cis* devido ao desequilíbrio de ligação entre os SNPs, a linhagem ainda teria um cromossomo de *CYP3A5* capaz de transcrever RNAm funcional, indutível por VDR em presença de vitamina D (existente no soro fetal bovino) em Caco-2.

Figura 30. Processo hipotético de ativação da transcrição de *CYP3A4* e *CYP3A5*, modulado por heterodímeros ativados de PXR-RXR ou CAR-RXR.

Nota: estatinas são ligantes para o PXR e CAR, e isso pode contribuir para o aumento na expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5*. *CYP3A4* possui dois sítios de ligação para os heterodímeros (PXRE e XREM), enquanto *CYP3A5* possui somente um sítio: PXRE. Esta diferença pode contribuir para explicar o maior efeito da atorvastatina sobre a indução da expressão de RNAm de *CYP3A4* comparado à indução de *CYP3A5*. Adaptado de WILLRICH; HIRATA; HIRATA, 2009.

Os resultados obtidos sugerem que as estatinas, mas não a ezetimiba, modulam a expressão gênica de *CYP3A4* e *CYP3A5* *in vitro*, possivelmente através da ativação de receptores nucleares. Este efeito, que é evidente no estudo de RNAm em HepG2 mas não para Caco-2, depende da linhagem celular em estudo, dos fatores de transcrição ativados e seus ligantes, bem como do tempo de tratamento e concentração do fármaco testado.

5.2 Estudos *in vivo*

Em CMSP, assim como nas linhagens celulares, a expressão basal de *CYP3A4* foi superior à expressão de *CYP3A5*. Este é o primeiro estudo a relatar a expressão de *CYP3A5* em CMSP, e sua associação com os transcritos de *CYP3A4*.

Ao comparar o conteúdo basal de RNAm entre as linhagens celulares e as CMSP, observamos a seguinte ordem de magnitude, tanto para *CYP3A4* como para *CYP3A5*: Caco-2 > CMSP > HepG2 ($p < 0,05$). Esta ordem de magnitude mostra que os níveis basais de expressão diferiram para cada tipo celular estudado.

Há uma correlação entre a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5*: a expressão dos transcritos está correlacionada antes ($r^2 = 0,22$; $p < 0,0001$) e após o tratamento ($r^2 = 0,58$; $p < 0,0001$) com atorvastatina, provavelmente porque *CYP3A4* e *CYP3A5* são reguladas pelos mesmos fatores de transcrição.

A atorvastatina não altera a expressão de RNAm para *CYP3A4* e *CYP3A5* nos indivíduos HC. Estes resultados podem ser reflexo da grande variabilidade interindividual descrita na literatura (KUEHL *et al.*, 2001; NEUVONEN *et al.*, 2006; MANGRAVITE; KRAUSS, 2007; LAMBA *et al.*, 2010) e também encontrada em nossa casuística. Os achados obtidos *in vitro* com a linhagem HepG2 não foram reproduzidos no estudo de expressão de RNAm em CMSP. Modelos celulares são muito diferentes dos modelos de estudo *in vivo*, visto que os primeiros são um ambiente isolado e controlado, enquanto no organismo há diferentes estímulos modulando a atividade celular, a presença de SNPs e o ambiente também exerce uma variação importante.

Curiosamente, a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP foi maior no grupo NL que no grupo HC. Poderíamos supor que a hipercolesterolemia inibe a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5*, no entanto, após o tratamento com atorvastatina, quando os valores de colesterol total e LDL-c diminuem, não observamos aumento de expressão de RNAm nos indivíduos HC. Neste estudo também avaliamos a atividade de *CYP3A in vivo* pela medida da razão 6 β OHC/cortisol, e assim como nos estudos de RNAm, encontramos uma grande variabilidade interindividual (coeficiente de variação de 240%, 2,4 vezes), que não foi associada com a resposta ao tratamento com atorvastatina. A atividade de *CYP3A* não foi modificada após o tratamento. Perera e

colaboradores (2009) utilizaram como marcador da atividade de *CYP3A* uma única medida plasmática para análise da relação do metabólito primário (1'-OH midazolam) a midazolam em 135 indivíduos negros saudáveis. Eles observaram variação de cerca de 20 vezes no fenótipo do midazolam, e isto está em concordância com nossas observações e de outros estudos, que chegaram a encontrar variações da ordem de 100 vezes (XIE *et al.*, 2004).

Assim como aconteceu com a expressão de RNAm em nosso estudo, a atividade de *CYP3A* foi maior nos indivíduos NL que nos indivíduos HC ($p < 0,0001$). Como não há estudos publicados relatando a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* em CMSP, ou atividade de *CYP3A* em hipercolesterolêmicos comparados com um grupo NL, os valores maiores encontrados no grupo NL para ambos os ensaios também é inédito. Sabe-se que *CYP3A4* e *CYP3A5* catalisam a síntese e metabolismo de esteróides endógenos e outros derivados lipídicos que tem um papel importante nas vias de sinalização intracelulares, além de seu já conhecido papel no metabolismo de xenobióticos (ZANGER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008), e talvez estes resultados estejam correlacionados com seu papel endógeno no organismo.

Muitos SNPs tem sido descritos, tanto em *CYP3A4* quanto em *CYP3A5*, mas eles explicam apenas uma pequena parte da variação observada tanto na expressão de RNAm como na atividade de *CYP3A*. Por isso, a abordagem do estudo de haplótipos torna-se cada vez mais importante. O grupo dos haplótipos formados pelas variantes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* e *CYP3A5*1D* é relatado pela primeira vez em nosso estudo. A frequência dos haplótipos foi semelhante nos grupos NL e HC ($p > 0,05$). Apesar de os haplótipos estarem associados com a etnia na população de nosso estudo ($p < 0,0001$), sabemos que a autodeclaração de etnia não reflete a ancestralidade da população brasileira, devido a sua heterogeneidade e diversidade (SUAREZ-KURTZ, 2009). Por isso, para a análise do impacto das variantes sobre a resposta ao tratamento, expressão gênica ou atividade, os indivíduos não foram distribuídos com base em sua etnia na população de nosso estudo.

Os haplótipos não foram associados com a resposta ao tratamento com atorvastatina nos indivíduos HC. No entanto, os indivíduos HC portadores dos grupos haplotípicos GAC, AAT e AGC apresentaram valores de CK mais elevados após o

tratamento quando comparados aos indivíduos portadores do haplótipo AGT (referência), e os portadores do haplótipo GGT, por sua vez, apresentaram menor atividade da CK ($p=0,022$). Os mecanismos que causam mialgia em pacientes tratados com estatinas ainda não são completamente conhecidos. Variantes do *SLCO1B1* foram associadas com maior incidência de efeitos colaterais (PASANEN *et al.*, 2007), e a variante *CYP3A5*3C* foi associada com maiores valores de CK (WILKE *et al.*, 2005). Em nosso estudo, não reproduzimos os achados de Wilke e colaboradores na análise de haplótipos. Ainda, como o número de indivíduos em cada grupo haplotípico é pequeno, isto pode ter contribuído para a diferença nos resultados.

Os grupos haplotípicos não influenciaram a expressão de RNAm de *CYP3A4*, antes ou após o tratamento com atorvastatina, provavelmente porque a variante *CYP3A4*1B* não interrompe completamente a transcrição de *CYP3A4* quando presente. Wang e colaboradores (2011) estudaram o efeito da variante *CYP3A4*1B* em amostras de hepatócitos, e como nós, não encontraram associação da variante com expressão de RNAm de *CYP3A4*.

A presença dos haplótipos GAC e GAT foi associada com níveis mais elevados de expressão de RNAm basal de *CYP3A5* quando comparados com o haplótipo referência AGT em indivíduos HC (**Tabela 14**). Este achado confirma o efeito deletério da variante *CYP3A5*3C* (A>G) que, por abolir um sítio de processamento do RNAm, gera uma proteína truncada de *CYP3A5*, sem função. Este efeito pode ser constatado no estudo de expressão basal de RNAm de *CYP3A5* em CMSP em nossa casuística.

Um ponto importante a se considerar é que o conjunto de iniciadores e sonda para a reação de PCRq de *CYP3A5* utilizado em nosso estudo amplifica um fragmento do RNA de *CYP3A5* entre o éxon 2 e 3, e portanto detecta não só o RNAm funcional, mas também todas as formas de transcritos variantes, não codificantes, gerados por variantes como a *CYP3A5*3C*. Portanto, embora alguns dos transcritos variantes sejam bastante instáveis e rapidamente degradados (BUSI; CRESTEIL, 2005) é possível que tenham sido quantificados pelo PCRq. Como a sequência de *CYP3A5* é muito semelhante à de *CYP3A4* entre os éxons 3 e 12, não há como desenhar um conjunto de iniciadores e sondas específico para o RNAm funcional de *CYP3A5*. Os ensaios de PCRq disponíveis comercialmente também detectam os RNAm variantes.

A atividade de CYP3A também não foi associada com os haplótipos antes ou após o tratamento com atorvastatina. Perera e colaboradores (2009) relatam que ao estudarem a variante *CYP3A5*3C* (somente), ela não foi associada com o metabolismo do midazolam *in vitro* (PERERA *et al.*, 2009). Como *CYP3A4* e *CYP3A5* tem sobreposição de substratos, é possível que *CYP3A4* consiga manter equilibrada a depuração dos seus substratos independentemente do genótipo de *CYP3A5* (PERERA *et al.*, 2009).

Podemos supor que as variantes não afetam a expressão ou atividade de CYP3A após o tratamento devido a indução que estas enzimas sofrem na presença de seus substratos, como a atorvastatina ou sinvastatina, por exemplo. Ainda, como relata Wang e colaboradores (2011), o impacto das variantes pode ser tecido-específico e afetar a expressão de RNAm e proteína somente no fígado, por exemplo.

Análise prévia das variantes (WILLRICH *et al.*, 2010), levando em conta os genótipos agrupados de acordo com sua funcionalidade igualmente não revelou associação com a resposta lipídica, expressão de RNAm ou atividade de CYP3A4 e CYP3A5. Na análise de haplótipos, contudo, nenhum grupo haplotípico foi agrupado com outro, de forma a avaliar individualmente o efeito de cada haplótipo. No entanto alguns grupos de haplótipos continham poucos indivíduos e isso pode ter contribuído para a falta de associação das variantes com a expressão de RNAm, atividade ou resposta lipídica.

Nossos resultados da análise haplotípica estão de acordo com publicações anteriores que estudaram o efeito das variantes individualmente. Não foi encontrada associação das variantes *CYP3A4*1B* (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c; CAVALLI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011) e *CYP3A5*3C* (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c, WANG *et al.*, 2011) com resposta ao tratamento com estatinas.

A expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* foi estudada em amostras de tecido hepático de pacientes por Wang e colaboradores (2011), que não encontraram associação das variantes com a expressão. O trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (WILLRICH *et al.*, 2008) que avaliou 93 indivíduos HC, na população brasileira, indicou que portadores do alelo **3C* de descendência caucasiana tiveram melhor resposta ao tratamento com atorvastatina, avaliando-se as reduções relativas de colesterol total e LDL-c, não foi reproduzido no presente estudo de haplótipos. No

entanto, na análise atual os indivíduos não foram distribuídos de acordo com sua etnia..

A recente descoberta da variante no íntron 6 de *CYP3A4* (rs35599367) (WANG *et al.*, 2011), torna sua semelhança com *CYP3A5* ainda maior, visto que sua principal variante, *3C, está localizada no íntron 3. Assim como ocorre com a variante *CYP3A5**3C, portadores da variante do íntron 6 de *CYP3A4* tem menor expressão de RNAm quando comparados aos não portadores. Wang e colaboradores (2011) apontam que os portadores da variante no íntron 6 de *CYP3A4* exigem doses menores de estatinas nos pacientes testados, enquanto as variantes *CYP3A4**1B e *CYP3A5**3C não influenciam o metabolismo das estatinas.

Considerando que *CYP3A4* e *CYP3A5* metabolizam juntas mais de 50% de todos os fármacos comercializados atualmente, o interesse em entender seu papel no metabolismo de fármacos amplamente utilizados, como as estatinas, é muito grande. É intrigante que após anos de estudo não se tenha encontrado uma “peça chave” capaz de explicar a variabilidade interindividual observada na expressão destes genes.

Os estudos de *Genome Wide Association* (GWA) terão papel importantíssimo nos próximos anos para continuar a identificar *loci* que afetam a resposta farmacológica ou a susceptibilidade a RA, ao investigar um grande número de SNPs em milhares de genes.

As CMSP e as linhagens HepG2 e Caco-2 apresentam perfis diferentes de expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5*, o que pode ser explicado por diferenças encontradas no efeito dos hipolipemiantes em cada tipo celular. Ainda, é preciso considerar o efeito dos fatores de transcrição disponíveis em cada célula, bem como o papel dos micro-RNAs e estado de metilação do DNA. Essas variáveis devem ser alvo de próximos estudos na busca do entendimento da grande variabilidade e onipresença de *CYP3A4* e *CYP3A5* nos diferentes tecidos.

As diferenças nos perfis de expressão entre CMSP, HepG2 e Caco-2 parecem indicar que as CMSP não são o modelo mais adequado para o estudo com atorvastatina, no entanto, são células de fácil obtenção e manipulação, e expressam RNAm de ambos os genes estudados. É provável que *CYP3A4* e *CYP3A5* tenham mecanismos de regulação da transcrição e tradução que sejam tecido-específicos,

como já mencionamos na discussão dos estudos *in vitro*, e sejam peças fundamentais para heterogeneidade observada na expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5*. Além disso, as estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos que podem ser correlacionados com expressão neste tipo celular.

Os principais resultados deste estudo foram:

- A expressão basal de *CYP3A4* e *CYP3A5* é diferente em cada tipo celular estudado. Caco-2 é a linhagem celular com maior expressão dos genes estudados.
- A atorvastatina e a sinvastatina aumentam a expressão de RNAm *CYP3A4* e *CYP3A5* *in vitro*, em linhagens celulares derivadas de hepatócitos (HepG2), no entanto, este efeito não foi traduzido à expressão das proteínas de *CYP3A4* e *CYP3A5*.
- Em Caco-2, a expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* permaneceu constante após os tratamentos com atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba (isoladamente ou em combinação com sinvastatina).
- A expressão de RNAm de *CYP3A4* e *CYP3A5* não foi afetada após os tratamentos com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas) nos indivíduos HC.
- A atividade de *CYP3A* não foi afetada pelo tratamento com atorvastatina nos indivíduos HC.
- Em CMSP, o haplótipo AGT (referência) está associado com expressão de RNAm basal de *CYP3A5* menor quando comparado com os haplótipos GAT e GAC.

- Os grupos haplotípicos não tiveram efeito importante na resposta lipídica, expressão de RNAm e atividade de CYP3A em indivíduos HC tratados com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Concluindo, os resultados deste trabalho nos permitem dizer que a atorvastatina e a sinvastatina, mas não a ezetimiba, influenciam a expressão de *CYP3A4* e *CYP3A5* *in vitro*, em linhagem derivada de hepatócitos (HepG2), e que este efeito não foi reproduzido em linhagem derivada de enterócitos (Caco-2) ou *in vivo*, em CMSP em indivíduos tratados com atorvastatina, onde encontramos uma grande variabilidade interindividual na expressão de RNAm e atividade de CYP3A4 e CYP3A5, independente do grupo haplotípico de cada indivíduo.

6. REFERÊNCIAS

- ARAZI, S.S.; GENVIGIR, F.D.; WILLRICH, M.A.; HIRATA, M.H.; DOREA, E.L.; BERNIK, M.; HIRATA, R.D.C. Atorvastatin effects on SREBP1 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.
- BALRAM, C.; ZHOU, Q.; CHEUNG, Y.B.; LEE, E.J. CYP3A5*3 and *6 single nucleotide polymorphism in three distinct Asian populations. **Eur J Clin Pharmacol.**, v.59, n. 2, p. 123-6, 2003.
- BARBER, M.J.; MANGRAVITE, L.M.; HYDE, C.L.; CHASMAN, D.I.; SMITH, J.D.; MCCARTY, C.A.; LI, X.; WILKE, R.A.; RIEDER, M.J.; WILLIAMS, P.T.; RIDKER, P.M.; CHATTERJEE, A.; ROTTER, J.I.; NICKERSON, D.A.; STEPHENS, M.; KRAUSS, R.M. Genome-wide association of lipid-lowering response to statins in combined study populations. **PLoS One**. 2010 Mar 22;5(3):e9763. PubMed PMID: 20339536; PubMed Central PMCID: PMC2842298.
- BAYS, H.; STEIN, E.A. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. **Expert Opin Pharmacother.** 2003 Nov;4(11):1901-38. Review. PubMed PMID: 14596646.
- BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins – Focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions . **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 50-57, 2004.
- BOGMAN, K.; PEYER, A.K.; TÖRÖK, M.; KÜSTERS, E.; DREWE, J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. **Br J Pharmacol.**, v.132, n. 6, p.1183-1192, 2001.
- BONN, V.; CHEUNG, R.C.; CHEN, B.; TAGHIBIGLOU, C.; VAN DERSTINE, S.C.; ADELI, K. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. **Atherosclerosis**, v.163, n.1, p.59-68, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p. 248 - 254, 1976.
- BURK, O.; WOJNOWSKI, L. Cytochrome P450 3A and their regulation. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v.369, n.1, p.105-24, 2004.
- BUSI, F.; CRESTEIL, T. CYP3A5 mRNA degradation by nonsense-mediated mRNA decay. **Molecular Pharmacology**, v.68, n.3, p.808-815, 2005.
- CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Detection of MbolI polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. **Clin Chem.**, v.47, n.2, p.348-51, 2001.

CAVALLI, S.A.; REBECCHI, I.M.M. MATSUMOTO, L.O.; BASQUES, H.H.; HIRATA, M.H.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; HIRATA, R.D.C. Lowering cholesterol response to atorvastatin in not influenced by CYP3A4*1B. **Biofarma**. 3(6): 29, 2008.

CERDA, A.; GENVIGIR, F.D.; RODRIGUES, A.C.; WILLRICH, M.A.; DOREA, E.L.; BERNIK M.M.; ARAZI, S.S.; OLIVEIRA, R.D., HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. Influence of Polymorphisms and Cholesterol-Lowering Treatment on SCARB1 mRNA Expression. **J Atheroscler Thromb**. 2011 Apr 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21512283.

CHAHOU, G.; AUDE, Y.W.; MEHTA, J.L. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? **Am J Cardiol.**, v.94, n.10, p.1260-1267, 2004.

CHEN, C.; MIRELES, R.J.; CAMPBELL, S.D.; LIN, J.; MILLS, J.B.; XU, J.J.; SMOLAREK, T.A. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. **Drug Metab Dispos.**, v.33, n.4, p.537-546, 2005.

CORSINI, A. The safety of HMG-CoA reductase inhibitors in special populations at high cardiovascular risk. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v.17, n.3, p.265-85, 2003.

DALY, A.K. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. **Nat Rev Genet**. 2010 Apr;11(4):241-6. Review. PubMed PMID: 20300088.

DAVIS JUNIOR, H.R.; ALTMANN, S.W. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an Intestinal Sterol Transporter. **Biochim Biophys Acta.**, v.1791, n.7, p.679-683, 2009.

DAVIS, H.R.; VELTRI, E.P. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. **J Atheroscler Thromb**. v.14, n.3, p. 99-108, 2007.

DEY, S.; PATEL, J.; ANAND, B. S.; JAIN-VAKKALAGADDA, B.; KALIKI, P.; PAL, D.; GANAPATHY, V.; MITRA, A. K. Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.44, n.7, p.2909-18, 2003.

DOMANSKI, T. L.; FINTA, C.; HALPERT, J.R.; ZAPHIROPOULOS, P.G. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. **Mol Pharmacol.**, v.59, n.2, p.386-92, 2001.

DURING, A.; DAWSON, H.D.; HARRISON, E.H. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. **J. Nutr.**, v. 135, n. 10, p. 2305-2312, 2005.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res**. 1992 Nov;33(11):1569-82. Review. PubMed PMID: 1464741.

EVANS, W. E.; McLEOD, H. L. Pharmacogenomics - drug disposition, drug targets and side effects. **N Engl J Med.**, v.348, p.538-549, 2003.

FELIX, C.A.; WALKER, A.H.; LANGE, B.J.; WILLIAMS, T.M.; WINICK, N.J.; CHEUNG, N.K.V.; LOVETT, B.D.; NOWELL, P. C.; BLAIR, I.A.; REBBECK, T.R. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. **Proc Natl Acad Sci.**, v.95, n.20, p.13176-13181, 1998.

FIEGENBAUM, M.; SILVEIRA, F.R.; VAN der SAND, C.R.; VAN der SAND, L.C.; FERREIRA, M.E.; PIRES, R.C.; HUTZ, M.H. Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. **Clin Chim Acta.**, 2005 Dec; v.362, n.1-2, p.182-8, 2005a.

FIEGENBAUM, M.; SILVEIRA, F.R.; VAN der SAND, C.R.; VAN der SAND, L.C.; FERREIRA, M.E.; PIRES, R.C.; HUTZ, M.H. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. **Pharmacogenomics J.**, v.5, n.6, p.359-64, 2005b.

FIEGENBAUM, M.; DA SILVEIRA, F.R.; VAND der SAND, C.R.; VAN der SAND, L.C.; FERREIRA, M.E.; PIRES, R.C.; HUTZ, M.H. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. **Clin Pharmacol Ther.**, v.78, n.5, p.551-, 2005c.

FUKUEN, S.; FUKUDA, T.; MAUNE, H.; IKENAGA, Y.; YAMAMOTO, I.; INABA, T.; AZUMA, J. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. **Pharmacogenetics**, v.12, n.4, p.331-4, 2002.

GARCÍA-OTÍN, A. L.; CIVEIRA, F.; ARISTEGUI, R.; DÍAZ, C.; RECALDE, D.; SOL, J.M.; MASRAMON, X.; HERNÁNDEZ, G.; POCOVÍ, M. Allelic polymorphism - 491A/T in apo E gene modulates the lipid-lowering response in combined hyperlipidemia treatment. **Eur J Clin Invest.**, v.32, n.6, p.421-8, 2002.

GELLNER, K.; EISELT, R.; HUSTERT, E.; ARNOLD, H.; KOCH, I.; HABERL, M.; DEGLMANN, C.J.; BURK, O.; BUNTEFUSS, D.; ESCHER, S.; BISHOP, C.; KOEBE, H.G.; BRINKMANN, U.; KLENK, H.P.; KLEINE, K.; MEYER, U.A.; WOJNOWSKI, L. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. **Pharmacogenetics**, v.11, n.2, p.111-21, 2001.

GENVIGIR, F.D.V.; SOARES, S.A.; HIRATA, M.H.; WILLRICH, M.A.V.; ARAZI, S.S.; REBECCHI, I.M.; OLIVEIRA, R.; BERNIK, M.M.; DOREA, E.L.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D.C. 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.

GENVIGIR, F.D.; RODRIGUES, A.C.; CERDA, A.; ARAZI, S.S.; WILLRICH, M.A.; OLIVEIRA R.; HIRATA, M.H.; DOREA, E.L.; BERNIK, M.M.; CURI, R.; HIRATA, R.D. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. **Pharmacogenomics**. 2010 Sep;11(9):1235-46. PubMed PMID: 20860464.

GENVIGIR, F.D.; RODRIGUES, A.C.; CERDA, A.; HIRATA, M.H.; CURI, R.; HIRATA, R.D. ABCA1 and ABCG1 expressions are regulated by statins and ezetimibe in Caco-2 cells. **Drug Metabol Drug Interact.** 2011;26(1):33-6. Epub 2011 Mar 16. PubMed PMID: 21417795.

GILLETT, R.C.; JR, NORRELL A. Considerations for safe use of statins: liver enzyme abnormalities and muscle toxicity. **Am Fam Physician.** 2011 Mar 15;83(6):711-6. Review. PubMed PMID: 21404982.

GRIMES, D.S. Are statins analogues of vitamin D? **Lancet.** 2006 Jul 1;368(9529):83-6. Review. PubMed PMID: 16815382.

GRUBE, M.; KÖCK, K.; OSWALD, S.; DRABER, K.; MEISSNER, K.; ECKEL, L.; BÖHM, M.; FELIX, S.B.; VOGELGESANG, S.; JEDLITSCHKY, G.; SIEGMUND, W.; WARZOK, R.; KROEMER, H.K. Organic anion transporter polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. **Clin Pharmacol Ther.** 80 (6): 607-20, 2006.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; MERZ, C.N.; BREWER, H.B.; JR, CLARK L.T.; HUNNINGHAKE, D.B.; PASTERNAK, R.C.; SMITH, S.C.; JR, STONE N.J. National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. **Circulation.** 2004 Jul 13;110(2):227-39. Review. Erratum in: *Circulation*. 2004 Aug 10;110(6):763. PubMed PMID: 15249516.

GUYTON, J.R. Combination regimens with statin, niacin, and intestinally active LDL-lowering drugs: alternatives to high-dose statin therapy? **Curr Opin Lipidol.** 2010 Aug;21(4):372-7. Review. PubMed PMID: 20625257.

GUZMÁN, E.C.R.; HIRATA, M.H.; QUINTÃO, E.C.R.; HIRATA, R.D.C. 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.

HABANO, W.; GAMO, T.; TERASHIMA, J.; SUGAI, T.; OTSUKA, K.; WAKABAYASHI, G.; OZAWA, S. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. **BMC Cancer.** 2011 Feb 22.

HOFFMANN, M.M.; WINKELMANN, B.R.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. The significance of genetic polymorphisms in modulating the response to lipid-lowering drugs. **Pharmacogenomics**, v.2,n.2, p.107-121, 2001.

HOU, R.; GOLDBERG, A.C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 2009 Mar;38(1):79-97. Review. PubMed PMID: 19217513.

HOWARD, W.J. The role of ezetimibe in the prevention of cardiovascular disease: where do we stand after ARBITER 6-HALTS. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** 2010 Jun;20(5):295-300. Erratum in: *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 May;21(5):390. PubMed PMID: 20556890.

HUMAN CYTOCHROME P450 (CYP) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE
<http://www.cypalleles.ki.se/> [acesso em 02 de maio de 2007].

HUSTERT, E.; HABERL, M.; BURK, O.; WOLBOLD, R.; HE, Y.Q.; KLEIN, K.; NUESSLER, A.C.; NEUHAUS, P.; KLATTIG, J.; EISELT, R.; KOCH, I.; ZIBAT, A.; BROCKMÖLLER, J.; HALPERT, J.R.; ZANGER, U.M.; WOJNOWSKI, L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. **Pharmacogenetics**, v.11, n.9, p.773-9, 2001.

IAKOUBOVA, O.A.; TONG, C.H.; ROWLAND, C.M.; KIRCHGESSNER, T.G.; YOUNG, B.A.; ARELLANO, A.R.; SHIFFMAN, D.; SABATINE, M.S.; CAMPOS, H.; PACKARD, C.J.; PFEFFER, M.A.; WHITE, T.J.; BRAUNWALD, E.; SHEPHERD, J.; DEVLIN, J.J.; SACKS, F.M. Association of the Trp719Arg polymorphism in kinesin-like protein 6 with myocardial infarction and coronary heart disease in 2 prospective trials: the CARE and WOSCOPS trials. **J Am Coll Cardiol** v.51, p.435-443, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo 2010. <http://www.ibge.gov.br> [acesso em 12 de maio de 2011].

JACOBSEN, W.; KUHN, B.; SOLDNER, A.; KIRCHNER, G.; SEWING, K.; KOLLMAN, P. A.; BENET, L. Z.; CHRISTIANS, U. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab Dispos**, v.28, n.11, p.1369-1378, 2000.

KAJINAMI, K.; BROUSSEAU, M. E.; ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J. CYP3A4 Genotypes and Plasma Lipoprotein Levels Before and After Treatment with Atorvastatin in Primary Hypercholesterolemia. **Am J Cardiol.**, v.93, n.1, p.104-7, 2004.

KATRAGADDA, S.; RAÍ, F.; ARORA, R. Dual inhibition, newer paradigms for cholesterol lowering. **Am J Ther.** 2010 Jul-Aug;17(4):e88-99. Review. PubMed PMID: 20634651.

KIVISTO, K. T.; NIEMI, M.; SCHAEFFELER, E.; PITKÄLÄ, K.; TILVIS, R.; FROMM, M. F.; SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; STRANDBERG, T. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. **Pharmacogenetics**, v.14, n.8, p.523-5, 2004.

KLEIN, T.E.; CHANG, J.T.; CHO, M.K.; EASTON, K.L.; FERGERSON, R.; HEWETT, M; LIN, Y.; LIU, S.; OLIVER, D.E.; RUBIN, D.L.; SHAFI, F.; SUART, J.M.; ALTMAN, R.B. "Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project" (220k PDF), **The Pharmacogenomics Journal** (2001) 1, 167.

KLIEWER, S. A. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. **J Nutr.**, v. 133, p. 2444S-2447S, 2003.

KOBAYASHI, K.; YAMANAKA, Y.; IWAZAKI, N.; NAKAJO, I.; HOSOKAWA, M.; NEGISHI, M.; CHIBA, K. Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor. **Drug Metab Dispos.** v.33, n.7, p. 924-929, 2005.

KOCAREK, T.A.; DAHN, M.S.; CAI, H.; STROM, S.C.; MERCER-HAINES, N.A. Regulation of CYP2B6 and CYP3A expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme A inhibitors in primary cultured human hepatocytes. **Drug Metab Dispos.** 2002 Dec;30(12):1400-5. PubMed [citation] PMID: 12433810

KOCH, I.; WEIL, R.; WOLBOLD, R.; BROCKMOLLER, J.; HUSTERT, E.; BURK, O.; NUESLER, A.; NEUHAUS, P.; EICHELBAUM, M.; ZANGER, U.; WOJNOWSKI, L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. **Drug Metab Dispos.** v.30, n.10, p.1108-14, 2002.

KOSOGLOU, T.; STATKEVICH, P.; JOHNSON-LEVONAS, A.O.; PAOLINI, J.F.; BERGMAN, A.J.; ALTON, K.B. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. **Clin Pharmacokinet.** v.44, n.5, p.467-94, 2005.

KUEHL, P.; ZHANG, J.; LIN, Y.; LAMBA, J.; ASSEM, M.; SCHUETZ, J.; WATKINS, P. B.; DALY, A.; WRIGHTON, S. A.; HALL, S. D.; MAUREL, P.; RELLING, M.; BRIMER, C.; YASUDA, K.; VENKATARAMANAN, R.; STROM, S.; THUMMEL, K.; BOGUSKI, M. S.; SCHUETZ, E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. **Nat Genet**, v.27, n.4, p.383-91, 2001.

LACROIX, D.; SONNIER, M.; MONCION, A.; CHERON, G.; CRESTEIL, T. Expression of CYP3A in the human liver - evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. **Eur J Biochem**, v.247, n.2, p.625-34, 1997.

LAKE, S.L.; LYON, H.; TANTISIRA, K.; SILVERMAN, E.K.; WEIS, S.T.; LAIRD, N.M.; SCHAID, D.J. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. **Hum Hered.** 55, 56-65 (2003).

LAMBA, V.; PANETTA, J.C.; STROM, S.; SCHUETZ, E.G. Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression. **J Pharmacol Exp Ther.** 2010 Mar; 332(3):1088-99. Epub 2009 Nov 24. PubMed PMID: 19934400; PubMed Central PMCID: PMC2835441.

LEE, S. J.; GOLDSTEIN, J. A. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. **Pharmacogenomics**, v.6, n.4, p.357-71, 2005.

LEHMANN, J. M.; MCKEE, D.D.; WATSON, M. A.; WILLSON, T. M.; MOORE, J. T.; KLEWER, S.A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. **J Clin Invest.**, v.102, n.5, p. 1016-23, 1998.

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

LIN, Y.S.; DOWLING, L.S.; QUIGLEY, S.D.; FARIN, F. M.; ZHANG, J.; LAMBA, J.; SCHUETZ, E. G.; THUMMEL, K. E. Co-Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Contribution to Hepatic and Intestinal Midazolam Metabolism. **Mol Pharmacol.**, v. 62, n.1, p.162-72, 2002.

LIU, T. C.; LIN, S.F.; CHEN, T.P.; CHANG, J.G. Polymorphism analysis of CYP3A5 in myeloid leukemia. **Oncology Reports.**, 9:327-329, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. 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.402-8, 2001.

LUO, X.; LI, X.M.; HU, Z.Y.; CHENG, Z.N. Evaluation of CYP3A activity in humans using three different parameters based on endogenous cortisol metabolism. **Acta Pharmacol Sin.** 2009 Sep;30(9):1323-9. Epub 2009 Aug 24. PubMed PMID: 19701237.

MANCIA, G; DE BACKER, G; DOMINICZAK A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY, A. M.; KJELDSSEN, S. E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A; SCHMIEDER, R. E.; BOUDIER, H. A.; ZANCHETTI, A.; VAHANIAN, A.; CAMM, J.; DE CATERINA, R.; DEAN, V.; DICKSTEAN, V.; FILIPPATOS, G.; FUNCK-BRENTANO, C.; HELLEMANS, I.; KRISTENSEN, S. D.; MC GREGOR, K.; SECHTEM, U.; SILBER, S.; TENDERA, M.; WIDIMSKY, P.; ZAMORANO, J. L.; ERDINE, S.; KIEWSKI, W.; AGABITI-ROSEI, E.; AMBROSIONI, E.; LINDHOLM, L. H.; VIIGIMAA, M.; ADAMOPOULUS, S.; AGABITI-ROSEI, E.; AMBROSIONI, E.; BERTOMEU, V.; CLEMENT, D.; ERDINE, S.; FARSANG, C.; GAITA, D.; LIP, G.; MALLION, J. M.; MANOLIS, A. J.; NILSSON, P. M.; O'BRIEN, E.; PONIKOWSKI, P.; REDON, J.; RUSCHITZKA, F.; TAMARGO, J.; VAN ZWIETEN, P.; WAEBER, B.; WILLIAMS, B. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of the arterial hypertension of the european society of hypertension (ESH) and of the european society of cardiology (ESC). **J Hypertens**, v.25, n.6, p. 1105-87, 2007.

MANGRAVITE, L.M.; THORN, C.F.; KRAUSS, R.M. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. The **Pharmacogenomics J.**, v.6, n.6, p.360-74, 2006.

MANGRAVITE, L.M.; KRAUSS, R.M. Pharmacogenomics of statin response.. **Curr Opin Lipidol.** 2007 Aug;18(4):409-14. Review. PubMed [citation] PMID: 17620857.

MARSHALL, T.G. Are statins analogues of vitamin D? **Lancet.** 2006 Oct 7;368(9543):1234; author reply 1235.

MARTIN, P.; RILEY, R.; BACK, D.J.; OWEN, A.; Comparison of the induction profile for drug disposition proteins by typical nuclear receptor activators in human hepatic and intestinal cells. **Br J Pharmacol.**, v.153, n.4, p.805-19, 2008.

MEPS. Medical Expenditure Panel Survey. Agency for healthcare research and quality. http://www.meps.ahrq.gov/mepsweb/data_files/publications/st205/stat205.pdf; 2005 [acesso em 12 de junho de 2011].

MIHOS, C.G.; SALAS, M.J.; SANTANA, O. The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease: a comprehensive review. **Cardiol Rev.** 2010 Nov-Dec;18(6):298-304. Review. PubMed PMID: 20926939.

MILLS, E.J.; WU, P.; CHONG, G.; GHEMENT, I.; SINGH, S.; AKL, E.A.; EYAWO, O.; GUYATT, G.; BERWANGER, O.; BRIEL, M. Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170,255 patients from 76 randomized trials. **QJM.** 2011 Feb;104(2):109-24. Epub 2010 Oct 7. Review. PubMed PMID: 20934984.

MOHAMMADI, A.; MACRI, J.; NEWTON, R.; ROMAIN, T.; DULAY, D.; ADELI, K. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.18, n.5, p.783-793, 1998.

NAGAI, F.; HIYOSHI, Y.; SUGIMACHI, K.; TAMURA, H.O. Cytochrome P450 (CYP) Expression in Human Myeloblastic and Lymphoid Cell Lines. **Biol. Pharm. Bull.**, 25(3), 383-385, Mar 2002.

NCBI SNP database (dbSNP) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> [acesso em 01 agosto 2011].

NEUVONEN, P.J. Drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): the importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics. **Curr Opin Investig Drugs.** 2010 Mar;11(3):323-32. Review. PubMed PMID: 20178046.

NEUVONEN, P. J.; NIEMI, M.; BACKMAN, J.T. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther.**, v.80, n.6, p.565-81, 2006.

NEUVONEN, P.J.; BACKMAN, J.T.; NIEMI, M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. **Clin Pharmacokinet.** 2008;47(7):463-74. Review. PubMed PMID: 18563955.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, v.139, p.271-279, 1991.

OMS. Organização Mundial de Saúde Website - www.who.int acesso em 01 de agosto de 2011.

PAN, Y.Z.; GAO, W.; YU, A.M. MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos.* 2009 Oct;37(10):2112-7. Epub 2009 Jul 6. PubMed PMID: 19581388; PubMed Central PMCID: PMC2769037.

PANDOR, A.; ARA, R.M.; TUMUR, I.; WILKINSON, A.J.; PAISLEY, S.; DUENAS, A.; DURRINGTON, P.N.; CHILCOTT, J. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Intern Med.** 2009 May;265(5):568-80. Epub 2008 Dec 28. Review. PubMed PMID: 19141093.

PASANEN, M.K.; FREDRIKSON, H.; NEUVONEN, P.J.; NIEMI, M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. **Clin Pharmacol Ther.** 2007 Dec;82(6):726-33. Epub 2007 May 2. PubMed PMID: 17473846.

PERERA, M.A.; THIRUMARAN, R.K.; COX, N.J.; HANAUER, S.; DAS, S.; BRIMER-CLINE, C.; LAMBA, V.; SCHUETZ, E. G.; RATAIN, M. J.; DI RIENZO, A. Prediction of CYP3A4 enzyme activity using haplotype tag SNPs in African-Americans. **Pharmacogenomics J.**, v.9, n.1, p.49-60, 2009.

PRUEKSARITANONT, T.; SUBRAMANIAN, R.; FANG, X. J.; MA, B.; QIU, Y.; LIN, J. H.; PEARSON, P.G.; BAILLIE, T.A. Iucuronidation of statins in animal and humans: A novel mechanism of statin lactonization. **Drug Metab Dispos.**, v.30, n.5, p.505-512, 2002.

QIU, H.; MATHAS, M.; NESTLER, S.; BENDEL, C.; NEM, D.; GODTEL-ARMBRUST, U.; LANG, T.; TAUDIEN, S.; BURK, O.; WOJNOWSKI, L. The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability. **Pharmacogenet Genomics.**, v.20, n.3, p.167 -78, 2010.

REBECCHI, I.M.M.; RODRIGUES, A.C.; ARAZI, S.S. GENVIGIR, F.D.; WILLRICH, M.A.; HIRATA, M.H.; SOARES, S.A.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; BERNIK, M.M.; DOREA, E.L.; DAGLI, M.L.; AVANZO, J.L.; HIRATA, R.D. ABCB1 and ABCC1 expression in peripheral mononuclear cells is influenced by gene polymorphisms and atorvastatin treatment. **Biochem Pharmacol.** 77 (1): 66-75, 2009.

REBBECK, T.R.; JAFFE, J.M.; WALKER, A.H.; WEIN, A.J.; MALKOWICZ, S.B. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. **J Natl Cancer Inst.**, v.90, n.16, p.1225-9, 1998.

REPA, J.J.; TURLEY, S.D.; QUAN, G.; DIETSCHY, J.M. Delineation of molecular changes in intrahepatic cholesterol metabolism resulting from diminished cholesterol absorption. **J Lipid Res.**, v.46, n.4, p.779-789, 2005.

RODRIGUES, A.C.; CURI, R.; BRITTO, L. R. G.; REBBECCHI, I. M. M.; HIRATA, M. H.; BERTOLAMI, M. C.; BERNIK, M. M. S.; DOREA, E. L.; HIRATA, R.D. C. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells, **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1760, n.12, p.1866 - 1873, 2006.

RODRIGUES, A.C.; CURI, R.; GENVIGIR, F.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. **Acta Pharmacol Sin.**, v.30, n.7, p.956-64, 2009a.

RODRIGUES, A.C.; CURI, R.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells. **Eur J Pharm Sci.** 2009 Jun 28;37(3-4):486-91. Epub 2009 Apr 23. PubMed PMID: 19394420. 2009b.

ROUITS, E.; BOISDRON-CELLE, M.; MOREL, A.; GAMELIN, E. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol in routine practice for CYP3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake. **Journal of Chromatography B**, v.793, n.2, p.357-366, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S. A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R.D.C.Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8, p. 1748-1750, 1998.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; GIANNINI, S.D.; FORTI, N., DIAMENT, J.; LIMA, T.M.; HIRATA, R.D.C. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clin Chim Acta**, v.300, n.1-2, p.139-149, 2000a.

SALAZAR, L.A, HIRATA, M.H., HIRATA, R.D.C. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor da LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **Rev. Bras. Anál. Clín.** 32: 195-199, 2000b.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ª ed., 3 vol. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2000.

SANDER, C. Genomic medicine and the future of health care. **Science**, 287:1977-8, 2000.

SCHMITZ, G.; DROBNIK, W. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol-lowering therapy. **Clin Chem Lab Med.** 2003 Apr;41(4):581-9. Review. PubMed [citation] PMID: 12747606.

SCHAID, D.J.; ROWLAND, C.M.; TINES, D.E.; JACOBSON, R.M.; POLAND, G.A. Score tests for association of traits with haplotypes when linkage phase is ambiguous. **Amer J Hum Genet.** 70, 425-434 (2002).

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther.** 2006 Oct;112(1):71-105. Epub 2006 May 22. Review. PubMed PMID: 16714062.

SIEST, G.; FERRARI, L.; ACCAOUI, M. J.; BATT, A. M.; VISVIKIS, S. Pharmacogenomics of drugs affecting the cardiovascular system. **Clin Chem Lab Med.**, v.41, n.4, p. 590-9, 2005.

SIMONS, L. A. Interrelations of lipids and lipoprotein in patients with coronary artery disease in 19 countries. **Am J Cardiol**, 57(14):5G

SIRTORI, C.R.; MOMBELLI, G.; TRIOLO, M.; LAAKSONEN, R. Clinical response to statins: Mechanism(s) of variable activity and adverse effects. **Ann Med**. 2011 May 31. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21623698.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v.88, p.1-19, 2007.

SORKIN, S. C.; FORESTIERO, F. J.; HIRATA, M. H.; GUZMÁN, E. C.; CAVALLI, S. A.; BERTOLAMI, M.C.; SALAZAR, L. A.; HIRATA, R. D. 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.

SUAREZ-KURTZ, G.; PERINI, J.A.; BASTOS-RODRIGUES, L. PENNA, S.D. STRUCHINER, C. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. **Pharmacogenomics**, 8 (10): 1299-306, 2007.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics and the genetic diversity of the Brazilian population. **Cad Saude Publica**. 2009 Aug;25(8):1650-1. English, Portuguese. PubMed PMID: 19649406.

SUDHOP, T.; LÜTJOHANN, D.; KODAL, A.; IGEL, M.; TRIBBLE, D.L.; SHAH, S.; PEREVOZSKAYA, I.; von BERGMANN, K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. **Circulation**, V.106, n.15, p.1943-1948, 2002.

TAKAGI, S.; NAKAJIMA, M. MOHRI, T.; YOKOI, T. Post-transcriptional Regulation of Human Pregnane X Receptor by Micro-RNA Affects the Expression of Cytochrome P450 3A4. **J Biol Chem.**, v.283, n.15, p.9674-80, 2008.

TEMEL, R.E.; TANG, W.; MA, Y.; RUDEL, L.L.; WILLINGHAM, M.C.; IOANNOU, Y.A.; DAVIES, J.P.; NILSSON, L.M.; YU, L. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. **J Clin Invest.**, v.117, n.7, p.1968-1978, 2007.

THUMMEL, K.E.; BRIMER, C.; YASUDA, K.; THOTTASSERY, J.; SENN, T.; LIN, Y.; ISHIZUKA, H.; KHARASCH, E.; SCHUETZ, J.; SCHUETZ, E. Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3. **Mol Pharmacol**. 2001 Dec;60(6):1399-406. PubMed PMID: 11723248.

TOBERT, J.A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**. 2003 Jul;2(7):517-26. Review. PubMed PMID: 12815379.

van HECK, M.; COMPTON, D.S.; DAVIS, H.R. The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys. **Eur J Pharmacol.**, v.415, n.1, p.79-84, 2001.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; 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 Biol.**, v.3, n.7, Research 0034, 2002.

VAUGHAN, C. J.; GOTTO JÚNIOR, A. M. Update on statins: 2003. **Circulation**, v.110, n.7, p.886-92, 2004.

VOHL, M. C.; SZOTS, F.; LEVIÈVRE, M.; LUPIEN, P. J.; BERGERON, J.; GAGNÉ, C.; COUTURE, P.; Influence of LDL receptor gene mutation and apo E polymorphism on lipoprotein response to simvastatin treatment among adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.160, n.2, p. 361-8, 2002.

WAGNER, M.; HALILBASIC, E.; MARSCHALL, H.U.; ZOLLNER, G.; FICKERT, P.; LANGNER, C.; ZATLOUKAL, K.; DENK, H.; TRAUNER, M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. **Hepatology**. v.42, n.2, p. 420-30, 2005.

WALKER, A. H.; JAFFE, J.M.; GUNASEGARAM, S.; CUMMINGS, S. A.; HUANG, C. S.; CHERN, H. D.; OLOPADE, O. I.; WEBER, B. L.; REBBECK, T. R. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. **Hum Mutat.**, v.12, n.4, p.289-293, 1998.

WANG, K.; CHEN, S.; XIE, W; WAN, Y. J. Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. **Biochem Pharmacol.**, v.75, n.11, p. 2204-13, 2008.

WANG, C.Y.; LIU, P.Y.; LIAO, J.K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med**. 2008 Jan;14(1):37-44. Review. PubMed PMID: 18068482; PubMed Central PMCID: PMC2621332.

WANG, D.; GUO, Y.; WRIGHTON, S.A.; COOKE, G.E.; SADEE, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. **Pharmacogenomics J**. 2011 Aug;11(4):274-86. doi: 10.1038/tpj.2010.28. Epub 2010 Apr 13. PubMed PMID: 20386561.

WATANABE, M.; KUMAI, T.; MATSUMOTO, N.; TANAKA, M.; SUZUKI, S.; SATOH, T.; KOBAYASHI, S. Expression of CYP3A4 mRNA is correlated with CYP3A4 Protein Level and Metabolic Activity in Human Liver. **J Pharmacol Sci.**, v.94, n.4, p.459-2, 2004.

WILKE, R.A.; MOORE, J.H.; BURMESTER, JK. Relative impact of CYP3A genotype and concomitant medication on the severity of atorvastatin-induced muscle damage. **Pharmacogenet Genomics**. 2005 Jun;15(6):415

WILKINSON, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. **N Engl J Med.**, v.352, p.2211-21, 2005.

WILLIAMS, J.A.; RING, B.J.; CANTRELL, V.E.; JONES, D. R.; ECKSTEIN, J.; RUTERBORIES, K.; HAMMAN, M. A.; HALL, S.D.; WRIGHTON, S.A. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. **Drug Metab Dispos.**, v.30, n.8, p.883-91, 2002.

WILLRICH, M.A.V.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Statin regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression. **Pharmacogenomics.**, v.10, n.6, p.1017-24, 2009.

WILLRICH, M.A.V.; HIRATA, M.H.; GENVIGIR, F.D.; ARAZI, S.S.; REBECCHI, I.M.; RODRIGUES, A.C.; BERNIK, M.M.; DOREA, E.L.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; HIRATA, R.D.C. CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. **Clin Chim Acta.** v.398, n.1-2, p. 15-20, 2008.

WILLRICH, M. A. V.; GENVIGIR, F.; RODRIGUES, A. C.; ARAZI, S.; OLIVEIRA, R.; HIRATA, M. H.; DOREA, E.L.; HIRATA, R. D. C.Relationship among CYP3A4 and CYP3A5 haplotypes, mRNA Expression, CYP3A activity and Atorvastatin response in Hypercholesterolemic Individuals In: AACC 2010 Annual Meeting, 2010, Anaheim. **Clinical Chemistry.** Washington: AACC Press, 2010. v.56. p.a89-a90.

WOJNOWSKI, L.; HUSTERT, E.; KLEIN, K.; GOLDAMMER, M.; HABERL, M.; KIRCHHEINER, J.; KOCH, I.; KLATTIG, J.; ZANGER, U.; BROCKMÖLLER, J. Re: Modification of clinical presentation of prostate tumours by a novel genetic variant in CYP3A4. **Journal of the National Cancer Institute**, 94 (8):630-632, 2002.

XIE, H. G.; WOOD, A. J.; KIM, R. B.; STEIN, C. M.; WILKINSON, G. R. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. **Pharmacogenomics**, v.5, n.3, p.243-72, 2004.

YAMANASHI, Y.; TAKADA, T.; SUZUKI, H. Niemann-Pick C1-like overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 320, n.2, p. 559-564, 2007.

YOO, J.; SEOL, B.; KIM, Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. **Nucleic Acids Res.**, v.33, p.W483-W488, 2005.

ZANGER, U.M.; TURPEINEN, M.; KLEIN, K.; SCHWAB, M. Functional pharmacogenetics /genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. **Anal Bional Chem.**, 392(6): 1093 – 108, 2008.

7. APÊNDICES

Apêndice 1.	Efeito dos hipolipemiantes sobre a proliferação e viabilidade celular.....	102
Apêndice 2.	<i>CYP3A5</i> *3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia	117
Apêndice 3.	Statin regulation of <i>CYP3A4</i> and <i>CYP3A5</i> expression.....	123
Apêndice 4.	Resumo das atividades desenvolvidas durante estágio na Mayo Clinic Rochester, MN, EUA.....	130

1. EFEITO DOS HIPOLIPEMIANTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

1.1 Curvas de crescimento das células Caco-2 e HepG2

As linhagens celulares Caco-2 e HepG2 foram mantidas sob condições normais de crescimento em meio DMEM, por períodos nunca superiores a três meses. As características morfológicas dessas linhagens estão apresentadas na **Figura 31**.

Figura 31. Cultura celular das linhagens Caco-2 (A) HepG2 (B) em meio DMEM por 48 h.

Nota: As células foram visualizadas e capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 100 (Heidelberg, AL).

As células HepG2 foram colocadas em garrafas de 75 cm² em uma concentração inicial de $0,5 \times 10^4$ células/mL em um volume total de 20 mL por garrafa. Neste ensaio, as células foram mantidas em cultura durante 8 dias consecutivos e as contagens foram realizadas a cada 24 h. Os dados apresentados foram obtidos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na **Figura 32**. Pode-se observar que o perfil de crescimento destas células se mostrou normal em relação às diferentes fases do crescimento de cultura celular (lag, logarítmica, estacionária e declínio).

As células Caco-2 foram mantidas em cultura por 120 h, a partir de 4×10^4 células/mL em um volume total de 2 mL. As contagens foram realizadas a cada 24 h. Os resultados obtidos podem ser visualizados na **Figura 33**. Pode-se observar que as células foram cultivadas em fase exponencial de crescimento, já que se observam no gráfico, apenas as fases do crescimento de cultura celular (exponencial e estacionária).

Como será visto a seguir, avaliou-se também a viabilidade das células Caco-2. O tempo de dobramento celular (TDC) da linhagem Caco-2 foi de 21,54 h.

$$\text{TDC}_{\text{HepG2}} = (19,37 \pm 0,71) \text{ h}$$

Figura 32. Curva de crescimento das células HepG2.

Nota: Representação gráfica do perfil de crescimento das células HepG2 durante 8 dias de cultura. Dados representam as médias $\pm$ SEM (n=2).

$$\text{TDC}_{\text{caco-2}} = (21,54 \pm 3,28) \text{ h}$$

Figura 33. Curva de crescimento das células Caco-2.

Nota: Representação gráfica do perfil de crescimento das células Caco-2 durante 5 dias de cultura a partir de 8×10^4 células. Dados representam a média $\pm$ SEM ($n = 6$).

1.2 Efeito das estatinas na morfologia e proliferação celular

Observa-se na **Figura 34** que o tratamento com atorvastatina afetou a morfologia celular e a proliferação das células HepG2 após 48 h de tratamento nas concentrações de 1, 10 e 20 μM . Isso provavelmente, se deve ao fato da atorvastatina inibir a via do mevalonato, importante para a manutenção e crescimento celular. Na **Figura 35**, observamos que o tratamento com sinvastatina afetou a morfologia celular e a proliferação das células HepG2 após 48 h de tratamento nas concentrações de 1 (discretamente) e 10 μM .

Para avaliarmos numericamente o efeito da atorvastatina e sinvastatina na proliferação celular da HepG2, foram realizadas curvas de crescimento para cada tratamento com concentrações variáveis (0 a 20 μM para atorvastatina por um período de 24 h e 0 a 10 μM de sinvastatina por um período de até 120 h). Esta

análise foi realizada a partir da contagem das células aderidas e os dados obtidos neste experimento são decorrentes de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Na **Figura 36**, observa-se que a atorvastatina exerce um efeito antiproliferativo no crescimento celular dos hepatócitos a altas concentrações (10 e 20 μM) a partir de 36 h de tratamento. Em menores concentrações de atorvastatina o efeito é evidenciado a partir de 48 h de tratamento (1 μM) ou nenhum efeito significativo é observado (0,1 μM). Baseado nas curvas de crescimento calculou-se TDC e pode-se observar um aumento, embora não significativo, no tempo de dobramento das células HepG2 no tratamento das células com 20 μM de atorvastatina (**Figura 37**).

Figura 34. Cultura de células HepG2 após 48 h de tratamento com atorvastatina 0-20 μM .

Nota: As células foram visualizadas e capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 100 (Heidelberg, AL).

Na **Figura 38**, observa-se que a sinvastatina exerce um efeito antiproliferativo significativo no crescimento celular dos hepatócitos na concentração de 10 μM , a partir de 72 h de tratamento. Embora em 48 h de tratamento observa-se uma queda significativa no número de células, este resultado não foi estatisticamente significativo, pois as análises foram realizadas com relação ao tempo inicial do experimento (e não com relação ao tempo avaliado anteriormente). Além disso, com o TDC e pode-se observar um aumento no tempo de dobramento das células HepG2 no tratamento das células com 10 μM de sinvastatina, após 48 h (**Figura 39**).

Figura 35. Cultura de células HepG2 após 48 h de tratamento com sinvastatina 0-10 μM .

Nota: As células foram visualizadas e capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 100 (Heidelberg, AL).

Com estes dados, nós podemos concluir que existe um efeito antiproliferativo da sinvastatina 10 μM a partir de 48 h de tratamento; no entanto a contagem celular sozinha não foi um método suficientemente sensível para detectar o efeito.

Figura 36. Curvas de crescimento das células HepG2 após tratamento com atorvastatina.

Nota: As células HepG2 foram mantidas por 96 h em cultura na ausência (0 μM) e presença de atorvastatina. Os dados representam a média $\pm$ SEM ($n = 2$) do número de células em diferentes tempos (A) e diferentes concentrações de atorvastatina (B). * $p < 0,05$, quando comparados com o controle (0 μM), como indicado pela análise por *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

Figura 37. Tempo de dobramento das células HepG2.

Nota: O TDC das células HepG2 foi determinado durante 4 dias de cultura em meio DMEM. Dados representam média $\pm$ SEM de 3 determinações. Análise realizada pelo teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

Figura 38. Curva de crescimento das células HepG2 após tratamento com sinvastatina.

Nota: As células HepG2 foram mantidas por 120 h em cultura na ausência (0 μM) e presença de sinvastatina. Dados representam média $\pm$ SEM ($n = 3$) do número de células em diferentes tempos. *** $p < 0,001$, quando comparados com o controle (0 μM), como indicado pela análise de *Two-way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni.

Figura 39. Tempo de dobramento celular (TDC) da linhagem HepG2.

Nota: O TDC da linhagem HepG2 foi determinado após 24 e 48 h de cultura celular em meio DMEM na ausência (0 μM) e presença de sinvastatina. Dados representam média $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0,001$, quando comparados com o controle (0 μM), como indicado pela análise de *Two-way ANOVA*, seguido pelo teste de Bonferroni.

1.3 Efeito das estatinas na viabilidade celular, fragmentação do DNA e ciclo celular

O tratamento com atorvastatina nas diferentes concentrações (0,1 a 20 μM) não afetou a viabilidade ou a fragmentação de DNA nas células HepG2. As células apresentaram viabilidade superior a 97% e o DNA fragmentado foi menor que 7%. Nas **Figuras 40 e 41**, estão representados os histogramas obtidos pela análise por citometria de fluxo para o controle (0 μM) e tratado com 20 μM . Pode-se observar que as células não apresentam perda de integridade de membrana (**Figura 42**) e o DNA está íntegro (**Figura 43**). Assim, o tempo de tratamento e as concentrações de atorvastatina são adequados para os experimentos a serem realizados.

Já para a linhagem Caco-2, na **Figura 42**, pode-se observar que o tempo de tratamento de 24 h não é adequado, pois a partir da concentração de 8 μM de atorvastatina, ocorre significativa perda de integridade de membrana. Diminuindo o tempo de tratamento para 12h, a atorvastatina já não apresenta mais citotoxicidade. Na análise de fragmentação de DNA, não houve diferenças entre os tempos de tratamento, nem entre as concentrações utilizadas (resultados não apresentados).

Figura 40. Viabilidade celular das células HepG2 após tratamento com atorvastatina.

Nota: A integridade de membrana das células HepG2 foi analisada por citometria de fluxo após 24h de tratamento com concentrações variáveis de atorvastatina (0 a 20 μM). A região M1 representa a baixa fluorescência emitida pelas células viáveis (membrana íntegra) e a região M2 representa a alta fluorescência emitida pelas células inviáveis (membrana não íntegra).

Figura 41. Efeito da atorvastatina na fragmentação do DNA das células HepG2.

Nota: A porcentagem de DNA fragmentado nas células HepG2 foi determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com atorvastatina (0 a 20 μ M). A região M1 representa a baixa fluorescência emitida pelas células com DNA fragmentado e a região M2 representa a alta fluorescência emitida pelas células com DNA íntegro.

Figura 42. Efeito da atorvastatina na viabilidade das células Caco-2.

Nota: A integridade de membrana foi analisada por citometria de fluxo após tratamento por 6 a 24 h com concentrações variáveis de atorvastatina (0 a 20 μ M). * $p < 0,05$, quando comparados com controle (0 μ M) pela análise de Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Na análise de ciclo celular das células HepG2 (**Figura 43**), podemos ver que em 12 h de tratamento ocorre uma parada de ciclo celular em fase G1 a partir da concentração de 1 μ M de atorvastatina com diminuição da porcentagem de células em

fase S e fase G2. Pode-se ainda afirmar que com 48 h de tratamento a atorvastatina na concentração de 4 μM induz a apoptose das células HepG2 que estavam paradas em G1 e assim os números de células em S e G2 aumentam com relação ao número total. A parada do ciclo celular em G1 já era esperada, pois a atorvastatina inibe a HMG-CoA redutase que converte HMG-CoA em mevalonato, substrato importante na passagem da célula da fase G1 para S. Ao relacionarmos os dados de ciclo celular com os de proliferação celular, pode-se concluir que a análise de ciclo celular é mais sensível que a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer por analisar diretamente o conteúdo de DNA.

Figura 43. Efeito da atorvastatina no ciclo celular das células HepG2.

Nota: * $p < 0,05$, quando comparados ao controle (0 μM), pela análise de One-way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett.

Investigou-se qual concentração de ácido mevalônico seria capaz de reverter a parada em G1 do ciclo celular causada pelo tratamento com atorvastatina. Assim, as células HepG2 foram tratadas com atorvastatina 20 μ M na presença ou ausência de ácido mevalônico lactona (Sigma, St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 0,2, 1, 2 e 4 mM. Inicialmente comprovou-se que nessas concentrações o mevalonato não é tóxico para as células, utilizando-se a análise morfológica, viabilidade celular e fragmentação de DNA. Posteriormente foi realizado o ensaio de ciclo celular. Após o tratamento com ácido mevalônico lactona, todas as concentrações testadas foram capazes de fazer as células progredirem durante o ciclo celular mesmo na presença da atorvastatina 20 μ M, retornando a valores de porcentagem de células em cada fase do ciclo equiparáveis ao controle (**Figura 44**).

Figura 44. Efeito do ácido mevalônico no ciclo celular das células HepG2 na presença ou ausência de atorvastatina 20 μ M.

Nota: Atv20: células tratadas com atorvastatina 20 μ M; mva: células tratadas com ácido mevalônico lactona; mva + atv20: células tratadas com ácido mevalônico lactona e atorvastatina 20 μ M. Valores representam média $\pm$ SEM, n = 2. *** p<0,001, quando comparados a atorvastatina 20 μ M, pela análise de One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

O tratamento com sinvastatina nas concentrações 0,01 a 1 μM não afetou a viabilidade ou a fragmentação de DNA nas células HepG2 (**Figura 45**). As células apresentaram viabilidade em torno de 97% e o DNA fragmentado foi em média 9%. No entanto, a partir de 48 h de tratamento, a sinvastatina a 10 μM diminuiu a viabilidade e a porcentagem de DNA não fragmentado, conforme as **Figuras 45 A e B**.

Figura 45. Efeito da sinvastatina na viabilidade (A) e fragmentação do DNA (B) das células HepG2.

Nota: A integridade de membrana das células HepG2 e a porcentagem de DNA fragmentado foram analisados por citometria de fluxo entre 12 e 72 h de tratamento com concentrações variáveis de sinvastatina (0 a 10 μM). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com controle (0 μM) pela análise de *Two-way ANOVA* seguido pelo teste de Bonferroni.

Na análise de ciclo celular das células HepG2 (**Figura 46**), podemos ver que em 24 h de tratamento ocorre uma parada de ciclo celular em fase G1 na concentração de 10 μM de sinvastatina com diminuição da porcentagem de células em fase S e fase G2.

A parada do ciclo celular em G1 já era esperada, pois a sinvastatina inibe a HMG-CoA redutase que converte HMG-CoA em mevalonato, substrato importante na passagem da célula da fase G1 para S.

Com relação às outras concentrações de sinvastatina utilizadas no experimento, podemos concluir que são subdoses para as células HepG2, e assim não são capazes de inibir a HMG-CoA redutase a ponto de reduzir significativamente a concentração de colesterol e, por isso, não há parada de ciclo celular. Estes resultados refletem o que já é estabelecido na literatura: a maior eficácia da atorvastatina quando comparada à sinvastatina.

Pode-se ainda afirmar que com 48 h de tratamento a sinvastatina a 10 μ M também induz a apoptose das células HepG2, com conseqüente diminuição do número de células em G1 e G2. Ao relacionarmos os dados de ciclo celular com os de proliferação celular, pode-se concluir que a análise de ciclo celular é mais sensível que a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer por analisar diretamente o conteúdo de DNA.

Figura 46. Efeito da simvastatina no ciclo celular das células HepG2.

Nota: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com controle (0 μM) pela análise de Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia

Maria Alice V. Willrich^{a,*}, Mario H. Hirata^a, Fabiana D.V. Genvigir^a, Simone S. Arazi^a, Ivanise M.M. Rebecchi^a, Alice C. Rodrigues^a, Marcia M.S. Bernik^b, Egidio L. Dorea^b, Marcelo C. Bertolami^c, André A. Faludi^c, Rosario D.C. Hirata^a

^a Department Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

^b University Hospital, Sao Paulo University, Sao Paulo, SP, Brazil

^c Institute of Cardiology Dante Pazzanese, Sao Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 April 2008
Received in revised form 29 July 2008
Accepted 31 July 2008
Available online xxxxx

Keywords:
CYP3A5
Hypercholesterolemia
Lipid-lowering response
Pharmacogenomics
Statins

ABSTRACT

Background: The cytochrome P450 isoenzyme 3A5 (CYP3A5) has an important role on biotransformation of xenobiotics. CYP3A5 SNPs have been associated with variations on enzyme activity that can modify the metabolism of several drugs.

Methods: In order to evaluate the influence of CYP3A5 variants on response to lowering-cholesterol drugs, 139 individuals with hypercholesterolemia were selected. After a wash-out period of 4 weeks, individuals were treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks). Genomic DNA was extracted by a salting-out procedure. CYP3A5*3C, CYP3A5*6 and CYP3A5*1D were analyzed by PCR-RFLP and DNA sequencing.

Results: >Frequencies of the CYP3A5*3C and CYP3A5*1D alleles were lower in individuals of African descent (*3C: 47.8% and *1D: 55.2%) than in non-Africans (*3C: 84.9% and *1D 84.8%, $p < 0.01$). Non-Africans carrying *3A allele (*3C and *1D combined alleles) had lower total and LDL-cholesterol response to atorvastatin than non-*3A allele carriers ($p < 0.05$).

Conclusion: CYP3A5*3A allele is associated with reduced cholesterol-lowering response to atorvastatin in non-African individuals.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Statins are potent inhibitors of the microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), which is a critical step in the endogenous cholesterol synthesis [1]. Reduction of intracellular cholesterol subsequently induces the expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor that increases the LDL uptake by hepatic and peripheral cells reducing dramatically the cholesterolemia [2].

Atorvastatin is one of the most potent HMGCR inhibitors [3]. Although atorvastatin is regarded safe, approximately 1 to 5% of patients will have adverse drug reactions such as muscle damage (weakness, myopathy, serum CK increase up to 10 times, rhabdomyolysis) [4]. Several factors have been related to variability in response to atorvastatin including drug pharmacokinetics.

Atorvastatin is metabolized primarily by CYP3A4 and CYP3A5 in the gut and liver, and it is further conjugated by glucuronidases UGT1A1 and 1A3, resulting in acyl-glucuronide intermediates [5]. Membrane transporters, such as P-glycoprotein also mediate the

cellular efflux of atorvastatin contributing to the overall drug bioavailability [6].

CYP3A4 and CYP3A5 are important drug metabolizing enzymes due to their abundance in the intestinal epithelium and liver, and its ability to metabolize a large number of chemically unrelated drugs [7]. Inter-individual variability in CYP3A expression in liver is very high (20–40 fold). This variability has been suggested to be associated with variants in CYP3A4 and CYP3A5 encoding genes that may contribute to the differences found in response to several drugs, including atorvastatin [7–9].

Several single nucleotide polymorphisms (SNP) have been described in the CYP3A5 [10–13]. The most common SNP appears to be A6986G (CYP3A5*3C), a genomic transition within intron 3 that creates a cryptic consensus splice site in the pre-mRNA, resulting in the incorporation of 131 bp of the intron 3 sequence in the mature mRNA (originating the so called pseudodexon 3B). This insertion causes a frameshift and may involve subsequent deletions or insertions or other intronic sequences. The abnormally processed RNAs (variant RNAs) contain several premature termination codons (PTC), so that the encoded protein is truncated, with loss of the enzyme activity [14]. Furthermore, wild-type CYP3A5*1A is differentially distributed among populations ranging from 10% in European individuals to 65% in Africans [15].

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 B.17 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3660; fax: +55 11 3813 2197.

E-mail addresses: malicewi@usp.br, mariaalicewillrich@yahoo.com.br (M.A.V. Willrich).

0009-8981/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

ARTICLE IN PRESS

2

M.A.V. Willrich et al. / Clinica Chimica Acta xxx (2008) xxx–xxx

Table 1
PCR primers sequences and thermal cycling conditions

SNP	Method of analysis	Primer sequence	Cycles	Annealing temperature	Size of the PCR product (bp)
A6986G (CYP3A5*3C) rs776746	PCR-RFLP	5'-CTTTAAAGAGCTCTTTGTCTC-TCA-3' 5'-CCAGGAAGCCAGACTTTGAT-3'	30	58	200
A6986G (CYP3A5*3C) rs776746	PCR sequencing	5'-TTGTGAGCACTTGATGATTACC-3' 5'-CCAGGAAGCCAGACTTTGAT-3'	35	60	370
G14690A (CYP3A5*6) rs not available	PCR-RFLP	5'-GTGGGTCTCTCTGCTCATGT-3'- 5'-GC**GAAACCAATTTAGGA ACT-3'	30	60	204
G14690A (CYP3A5*6) rs not available	PCR sequencing	5'-GTGGGTCTCTCTGCTCATGT-3'- 5'-GGCTCTAGATTGACAAAACATTTT-3'	35	63	403
C31611T (CYP3A5*1D) rs17161788	PCR sequencing	5'-TGCTTTTACTATCCAGTATTACCC-3' 5'-GCCCATCTTTATTTCAAGGTTT-3'	35	59	378

Reference: www.ncbi.nlm.nih.gov, GenBank access number: AC 005020.

(*) Primer degenerated base.

(**) Non-complementary region.

CYP3A5*3C allele has been associated with higher statin response in a study with 46 hypercholesterolemic patients after 1 y treatment with several statins [16]. Homozygous CYP3A5*3C has been also associated with serum CK elevation in patients experiencing myalgia [17]. On the other hand, this SNP was not associated with response to simvastatin in Brazilian individuals of the European descent [18]. In addition, Chasman et al. evaluated 148 SNPs in hypercholesterolemic patients under pravastatin treatment and concluded that none of the 6 CYP3A5 SNPs studied was associated with variation on the lowering-lipid response after 24 weeks of treatment [19].

Another CYP3A5 SNP is G14690A (CYP3A5*6) that causes a partial deletion on exon 7 and results in a truncated protein with no functional activity [11]. This variant is found in African-derived individuals with frequency of 12% and in Caucasian individuals in frequency <1% [15,20].

SNPs located in 5' and 3' untranslated regions (UTR) of CYP3A5 gene have also been described [15]. It is noteworthy that CYP3A5*1D SNP, located in the 3'UTR, is in linkage disequilibrium with CYP3A5*3C [10,14]. Both alleles present in the same individual originate CYP3A5*3A allele [11]. SNPs on UTRs tend to cause lower stability on mRNAs, affecting the expression rate and the catalytic activity of the enzyme [15]. In this study we evaluated the influence of the CYP3A5*3C, CYP3A5*6 and CYP3A5*1D variants and their effects on lipid-lowering response to atorvastatin in Brazilian hypercholesterolemic individuals.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and study protocol

The characteristics of the study design have been previously reported [21–23]. Briefly, 139 hypercholesterolemic (HC) individuals were selected at 2 Clinical Research Centers of Sao Paulo City, Brazil. Individuals with hypertriglyceridemia (triglycerides ≥ 4.52 mmol/l [approximately 400 mg/dl]), hypothyroidism, diabetes mellitus, liver or kidney diseases, and other forms of secondary dyslipidemia were excluded from this study.

All patients were informed about the study protocol and then agreed to participate as volunteers by signing the consent. The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Dante Pazzanese Institute of Cardiology, University Hospital of the Sao Paulo University and School of Pharmaceutical Sciences of the Sao Paulo University, Sao Paulo, Brazil.

Information on age, body mass index (BMI), blood pressure, menopause status, tobacco smoking, alcohol consumption, hypertension, obesity, family history of coronary artery disease (CAD), physical activity and medication in use were recorded. Current tobacco smoking was defined as a daily intake of one or more cigarettes. We considered as "alcohol consumption" a daily intake of beer, wine, and distilled spirits of >1 g/day. Physical activity was considered the practice of sports, for example walking, running or swimming for at least 2 h/week. Each individual declared his ethnic group during the interview, as recommended by the most recent Brazilian Census [38].

The patients went through a wash-out period of four weeks with a low-fat diet (according to American Heart Association step one diet) [24] followed by 4 weeks of treatment with atorvastatin 10 mg orally once daily. Compliance to the low-fat diet was monitored through measurement of serum lipids after 4 weeks. Before and after atorvastatin therapy, all patients were evaluated for serum concentrations of lipids, alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CK). Patients continued taking

other medications throughout the study that include diuretics, ACE inhibitors, β -blockers and calcium channel blockers.

2.2. Biochemical analyses

Blood samples were collected after a 12 hour fast, before and after the 4 week treatment with atorvastatin 10 mg/day. Serum total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides were measured using routine enzymatic methods. LDL and very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol were calculated using the Friedewald formula [25]. Plasma apolipoprotein AI (apoAI) and apolipoprotein B (apoB) were determined by nephelometry. Serum ALT and CK were determined to detect liver and muscle damage during treatment with atorvastatin.

2.3. CYP3A5 genotyping

Genomic DNA was isolated from 1 ml EDTA-anticoagulated whole blood samples using a salting-out method described by our group [26]. CYP3A5*3C and CYP3A5*6 SNPs were detected by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment analysis (RFLP). CYP3A5*1D was detected by DNA sequencing. Primer sequences and PCR thermal cycling conditions used in this study are displayed in Table 1.

PCR assays contained 100 ng genomic DNA, 200 nmol/l primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA), 200 mmol/l dNTPs (GE Healthcare, Amersham Bioscience, Sao Paulo, Brazil), 1 U DNA polymerase and PCR buffer [50 mmol/l KCl, 20 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/l MgCl₂, 75 mmol/l Tris-HCl (pH 9.0)], (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) in 50 μ l total volume. PCR thermal cycling conditions consisted of initial incubation at 98 °C for 3 min, followed by 30–35 cycles at 95 °C for 1 min, 58 °C–63 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension period of 72 °C for 10 min. Amplification was carried out in a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA). PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining.

PCR products (5 μ l) were digested with 5 U of the restriction endonuclease DdeI (Promega Corporation, Madison, WI) for 4 h at 37 °C. The fragments were analyzed by 8% polyacrylamide gel electrophoresis after silver or SYBR Gold® (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Eugene, OR) staining. Every restriction product had, in their sequence, not only a polymorphic site, but also a constitutive site (which allows monitoring of enzyme activity during the reaction). Thirty percent of the samples were re-tested randomly by RFLP in order to guarantee that the genotype once obtained is strictly correct. Genotype controls were used in every PCR-RFLP assay.

Genotyping accuracy was confirmed by DNA sequencing using the capillary electrophoresis system Mega BACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Five percent of all samples were amplified by PCR using sets of primers (Table 1) designed with Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA), based on the available gene sequence (Access number AC005020) on GenBank from National Institute of Health (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/). Purified PCR products (370 bp) were sequenced in two directions using standard protocols of the Termino Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

2.4. Statistical analysis

Categorical variables were compared by chi-square test or Exact Fisher test. The agreement of CYP3A5*3C genotypes frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested using the MS-DOS QBasic V. 1.1 (Microsoft Informatica Ltd, Sao Paulo, Brazil). Continuous variables were presented as means $\pm$ standard deviation (SD) and compared by t-test. Variables without normal distribution were log transformed for analysis. The effects of the SNPs on serum lipids and apolipoproteins before and after treatment with atorvastatin were evaluated by Paired t-test or Mann Whitney Rank Sum Test. Differences in serum

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

ARTICLE IN PRESS

M.A.V. Willrich et al. / Clinica Chimica Acta xxx (2008) xxx–xxx

3

Table 2
Anthropometric and demographic variables of the hypercholesterolemic individuals

Variables	Total	Non-African	African	p
N	139	93	46	
Gender (women)	68%	61%	80%	0.038
Age (y)	57±11	57±12	58±10	NS
Hypertension	58%	50%	72%	0.028
DBP (mm Hg)	85±13	84±13	88±14	NS
SBP (mm Hg)	134±22	133±23	138±19	NS
Menopause ^a	86%	49%	72%	0.023
Obesity ^b	28%	27%	30%	NS
BMI (kg/m ²)	28±4	27±4	28±4	NS
Tobacco smoking	16%	65%	13%	NS
Alcohol consumption	3%	4%	0%	NS
Physical activity ^c	45%	45%	45%	NS
Familiar history of CAD	57%	59%	50%	NS
Allele frequencies				
CYP3A5*1A (functional)	24.5%	13.6%	45.7%	<0.001
CYP3A5*3C	72.7%	84.9%	47.8%	<0.001
CYP3A5*1D	74.6%	84.8%	55.2%	<0.001
CYP3A5*6	2.2%	0%	6.8%	0.002
CYP3A5*3A (*3C+*1D)	70.1%	82.6%	45.7%	<0.001
Concomitant medication				
CYP3A substrates ^c	4.3%	4.3%	4.3%	NS
CYP3A and PgP substrates ^d	5.0%	5.4%	4.3%	NS
CYP3A and PgP inhibitors ^e	3.6%	3.2%	4.3%	NS
CYP3A substrates/PgP inhibitors ^f	7.2%	9.7%	2.2%	NS

N = number of individuals. BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure. Continuous variables are presented as mean±SD and were compared by t-test. Categorical variables were compared by chi-square or Exact Fisher test.

^a Seven women refused to inform their menopausal status (4 European and 3 African descents).

^b Two African descents did not have their obesity and physical status evaluated.

^c CYP3A substrates: clonazepam, reboxetine, amlodipine, teophylline.

^d CYP3A and PgP substrates: prednisone, dihydroergocristin.

^e CYP3A and PgP inhibitors: norfloxacin, fluoxetine, sertraline, paroxetine.

^f CYP3A substrates/PgP inhibitors: nifedipine, propranolol.

3. Results

3.1. HC patient data

Anthropometric and demographic results of the studied group are shown in Table 2. The individuals enrolled in this study were either from African descent (46 individuals) and non-African descent (93 individuals). Two Africans had not their obesity and physical status evaluated. The number of women and the frequency of menopause were higher in African group when compared with non-Africans ($p<0.05$). Hypertension was also more frequent in Africans ($p=0.028$), but no differences were found in diastolic and systolic blood pressures due to the effect of the antihypertensive medication that these individuals were using during the study. The mean age and BMI, and the frequencies of obesity, tobacco smoking, alcohol consumption, physical activity and familiar history of CAD were similar between both groups ($p>0.05$). The use of concomitant medication that were either inhibitors or substrates for CYP3A and/or PgP was similar in African and non-African individuals ($p>0.05$) (Table 2).

3.2. CYP3A5 allele frequencies

The genotype distributions of CYP3A5*3C, CYP3A5*6 and CYP3A5*1D SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in both African and non-African groups ($p>0.05$). Frequencies of CYP3A5*3C and *1D alleles were significantly lower in African individuals (*3C: 47.8%, $p<0.001$; *1D: 55.2%) than in non-African (*3C: 84.9%; *1D: 84.8%, $p<0.001$) (Table 2). The rare CYP3A5*6 allele was detected in heterozygosis only in African-descent individuals (6.8%).

As expected, CYP3A5*3C and CYP3A5*1D SNPs were in linkage disequilibrium in HC individuals ($\chi^2=159.768$; $p<0.001$, D' index=0.8955). The presence of both alleles CYP3A5*3C and CYP3A5*1D simultaneously in the same individual originates CYP3A5*3A allele. CYP3A5*3A allele was the most prevalent combination (70.1%) found in our sample (Table 2).

3.3. CYP3A5 SNPs and response to atorvastatin

Based on the ethnics differences in allele and genotype frequencies, the relationships between the studied SNPs (CYP3A5*3C, *1D and *3A) and serum lipid profile were analyzed separately in African- and non-African-descent individuals. Data from individuals carrying

lipids in response to atorvastatin treatment were expressed as % of baseline values. The linkage disequilibrium (LD) between 2 SNPs was measured using the D' index and it was determined using SNPAnalyzer software [27]. Statistical tests were performed by SAS System for Windows software ver. 8.02 (SAS Institute Inc, 1999–2001, Cary, NC). Significance was assumed for $p<0.05$.

Table 3
Influence of the CYP3A5 variants on serum lipids in non-African-descent individuals

Variable (mg/dl)	*3C/*3C (66)	*1A/*1A+*1A/*3C (27)	p	*1D/*1D (66)	*1A/*1A+*1A/*1D (26)	p	*3A/*3A (62)	*1A/*1A+*1A/*3A (30)	p
TC									
Baseline	281±37	278±42	NS ^a	282±39	274±39	NS ^b	281±38	278±40	NS ^b
Atorvastatin	201±34	187±35	0.039 ^a	202±30	183±33	0.010 ^a	202±30	186±33	0.018 ^a
% change	-28.2±9.0	-32.8±7.2	0.005 ^a	-27.9±9.2	-33.1±7.1	0.010 ^a	-27.6±9.3	-33.1±6.9	0.005 ^a
LDL-c									
Baseline	193±35	191±36	NS ^a	193±37	188±34	NS ^b	192±36	190±35	NS ^b
Atorvastatin	120±29	110±29	NS ^a	121±29	108±28	0.043 ^a	121±24	109±28	NS ^a
% change	-37.6±12.6	-42.1±8.6	0.034 ^a	-36.8±12.7	-42.9±8.4	0.029 ^a	-36.7±13.0	-42.5±8.3	0.028 ^a
HDL-c									
Baseline	53±14	56±13	NS ^a	54±15	54±12	NS ^b	53±14	56±13	NS ^b
Atorvastatin	52±12	51±12	NS ^a	52±13	50±11	NS ^b	52±13	51±12	NS ^b
% change	-1.2±10.1	-8.2±11.6	0.024 ^a	-1.9±10.4	-7.1±11.4	0.040 ^a	-1.3±10.1	-7.8±11.4	0.006 ^a
VLDL-c									
Baseline	35±14	31±12	NS ^a	35±14	32±13	NS ^b	35±14	32±13	NS ^a
Atorvastatin	29±12	24±10	NS ^a	29±12	25±10	NS ^b	29±12	25±10	0.049 ^b
% change	-12.8±30.4	-18.7±19.2	NS ^a	-13.07±30.2	-19.4±19.7	NS ^b	-12.4±31.0	-20.0±18.7	NS ^b
TG									
Baseline	176±70	153±59	NS ^a	174±70	162±67	NS ^b	176±71	159±64	NS ^a
Atorvastatin	145±60	121±48	NS ^a	144±60	126±50	NS ^b	146±60	123±48	0.010 ^a
% change	-12.8±30.4	-18.7±19.2	NS ^a	-13.07±30.2	-19.4±19.7	NS ^b	-12.4±31.0	-20.0±18.7	NS ^b
ApoA1									
Baseline	129±29	131±25	NS ^a	129±29	132±25	NS ^b	130±30	131±24	NS ^a
Atorvastatin	132±27	132±28	NS ^a	135±29	131±27	NS ^b	135±29	132±27	NS ^b
% change	2.2±14.1	0.1±12.2	NS ^a	2.3±14.2	-1.0±11.8	NS ^b	2.8±14.0	-0.1±11.6	NS ^a
ApoB									
Baseline	141±21	137±26	NS ^a	142±21	127±27	NS ^b	142±21	141±25	NS ^a
Atorvastatin	102±20	94±22	NS ^a	102±19	95±22	NS ^b	102±19	92±19	0.020 ^a
% change	-42.4±25.3	-50.7±28.6	NS ^a	-41.2±24.2	-50.5±28.9	NS ^b	-41.4±24.3	-55.6±20.4	0.004 ^b

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean±SD. Results were compared by t-test^(a) or Mann Whitney Rank Sum Test^(b).

ApoA1, apolipoprotein A1; ApoB, apolipoprotein B; TC, total cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides.

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

ARTICLE IN PRESS

4

M.A.V. Willrich et al. / Clinica Chimica Acta xxx (2008) xxx–xxx

Table 4
Influence of the CYP3A5 variants on serum lipids in African-descent individuals

Variable (mg/dl)		*3C/*3C (10)	*1A/*1A+*1A/*3C (36)	p	*1D/*1D (15)	*1A/*1A+*1A/*1D (33)	p	*3A/*3A (9)	*1A/*1A+*1A/*3A (38)	p
TC	Baseline	279±42	284±38	0.664 ^a	280±34	284±40	0.777 ^a	276±47	286±31	0.310 ^a
	Atorvastatin	204±33	204±30	0.928 ^a	199±27	205±31	0.547 ^a	196±25	206±31	0.398 ^a
	% change	-26.4±11.2	-27.5±10.8	0.651 ^a	-28.4±10.9	-27.2±11.0	0.625 ^b	-26.8±11.8	-27.3±10.5	0.897 ^a
LDL-c	Baseline	191±34	196±36	0.683 ^a	191±30	196±38	0.947 ^b	190±40	196±36	0.482 ^b
	Atorvastatin	120±26	121±25	0.870 ^a	115±23	122±26	0.330 ^a	115±21	122±26	0.423 ^a
	% change	-36.9±10.7	-37.0±14.5	0.840 ^a	-36.9±12.0	-36.3±14.1	0.467 ^a	-37.7±11.0	-37.0±13.8	0.822 ^a
HDL-c	Baseline	57±14	61±13	0.305 ^a	58±14	62±14	0.391 ^b	55±13	62±14	0.185 ^b
	Atorvastatin	57±10	59±14	0.607 ^a	57±11	60±14	0.555 ^b	55±9	60±14	0.317 ^b
	% change	2.8±18.2	-2.1±9.2	0.337 ^a	1.1±16.6	-3.2±9.3	0.263 ^b	4.0±18.9	-2.7±9.3	0.130 ^a
VLDL-c	Baseline	26±8	27±11	0.925 ^a	28±11	26±10	0.697 ^b	34±14	27±11	0.735 ^b
	Atorvastatin	25±8	23±7	0.464 ^a	26±10	23±6	0.410 ^b	25±8	23±7	0.656 ^a
	% change	-2.5±37.6	-9.5±21.8	0.312 ^a	-1.9±32.2	-9.3±21.9	0.357 ^a	-9.7±32.2	-9.5±21.2	0.394 ^a
TG	Baseline	130±38	136±54	0.925 ^a	142±57	132±50	0.697 ^b	168±70	136±53	0.735 ^b
	Atorvastatin	126±41	116±36	0.464 ^a	132±48	114±32	0.410 ^b	123±42	117±36	0.656 ^a
	% change	-2.53±37.6	-9.5±21.8	0.312 ^a	-1.9±32.2	-9.3±21.9	0.357 ^a	-9.7±32.2	-9.5±21.2	0.394 ^a
ApoAI	Baseline	124±21	135±20	0.123 ^a	128±25	141±26	0.143 ^a	127±26	139±21	0.208 ^b
	Atorvastatin	123±23	140±20	0.021 ^a	128±20	144±26	0.029 ^a	122±22	145±26	0.020 ^a
	% change	3.6±24.9	-3.0±10.5	0.571 ^a	-0.4±22.5	1.5±11.4	0.722 ^a	-4.4±26.6	3.4±10.2	0.475 ^b
ApoB	Baseline	149±28	139±21	0.322 ^a	157±44	144±25	0.244 ^a	159±53	145±25	0.240 ^a
	Atorvastatin	108±24	97±16	0.155 ^a	104±14	99±19	0.413 ^a	102±18	100±18	0.739 ^a
	% change	-38.9±24.5	-47.7±28.8	0.452 ^a	-41.3±23.6	-50.3±32.3	0.404 ^a	-40.1±26.2	-48.7±30.3	0.500 ^b

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean±SD. Results were compared by t-test^(a) or Mann Whitney Rank Sum Test^(b). ApoAI, apolipoprotein I; ApoB, apolipoprotein B; TC, total cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides.

non-functional alleles in homozygous form (*3C/*3C, *1D/*1D, or *3A/*3A genotypes) were compared with those carrying one or two functional alleles (*1A/*1A and *1A/*3C or *1A/*1D).

Baseline lipid profiles were similar between carriers and non-carriers of the CYP3A5 variant alleles in both non-African- (Table 3) and African-descent (Table 4) individuals. These results are suggestive that CYP3A5*3C, CYP3A5*1D and CYP3A5*3A variants are not related with differences in baseline serum lipids in hypercholesterolemic individuals.

Non-African-descent individuals carrying CYP3A5*3C allele (*3C/*3C genotype) had lower reduction of total (28.2%) and LDL-cholesterol (37.6%) in serum than group carrying CYP3A5*1A allele (*1A/*1A+*1A/*3C genotypes) (TC: 32.8% and LDL-c: 42.1%, $p<0.05$) (Table 3). Reduction of serum HDL-cholesterol was lower in CYP3A5*3C individuals (1.2%) when compared with the *1A allele carriers (8.2%, $p=0.024$). These results suggest that CYP3A5*3C variant is associated with decreased response to atorvastatin in non-African-descent individuals.

Analysis of the CYP3A5*1D variants showed that *1D allele (*1D/*1D genotype) carriers had lower reduction in total (27.9%), LDL- (36.8%) and HDL-cholesterol (1.9%) than in non-African individuals carrying CYP3A5*1A allele (*1A/*1A+*1A/*1D genotypes) (TC: 33.1%; LDL-c: 42.9% and HDL-cholesterol: 7.1%; $p<0.05$) (Table 3). Similar results were also found between *3A allele (*3A/*3A haplotype) and CYP3A5*1A allele carriers (Table 3). Additionally, apoB was more reduced ($p=0.004$) and serum triglycerides and VLDL-cholesterol were mildly decreased ($p=0.049$) after atorvastatin treatment for CYP3A5*1A allele carriers. Fig. 1 shows individual data for serum TC, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol values before and after atorvastatin treatment in non-African individuals carrying CYP3A5*3A and *1A alleles.

CYP3A5 SNPs did not influence serum lipids response to atorvastatin in African-descent individuals (Table 4). Nevertheless, apoAI was increased by atorvastatin in *1A allele carriers but not in those carrying *3C/*3C, *1D/*1D and *3A/*3A genotypes ($p<0.05$).

CYP3A5*6 was not associated with variations in serum lipid profile before or after atorvastatin treatment in African-descent individuals (data not shown).

Relations between CYP3A5 SNPs and other variables were also evaluated. Gender, hypertension, and increased serum activities of CK and ALT were not associated with the presence of the CYP3A5*3C, *1D or *3A alleles ($p>0.05$) (data not shown). The use of concomitant

medications, including substrates or inhibitors for CYP3A and/or Pgp, that may interfere on response to atorvastatin was also not related to CYP3A5 variants independently of the ethnic background ($p>0.05$) (data not shown).

4. Discussion

4.1. CYP3A5 allele frequencies

This study examined the allele frequencies of CYP3A5 SNPs and their relationship with the response to atorvastatin in a sample of HC individuals from our population.

In non-Africans, the frequency of the CYP3A5*3C allele (84.9%) was similar to those found in other Caucasian populations (85.2 to 93.2%, $p>0.05$) including Brazilian samples [15,17,18,28,29]. CYP3A5*3C allele is considered the most common allele in Caucasians and it has been suggested that it is of ancient origin [30]. The frequency of the CYP3A5*3C allele in the African-derived sample (47.8%) was similar to that found in African-Americans (47.5%) [11], but it was more frequent than in other African populations (32.2%, $p=0.030$) [15]. It is well known that CYP3A5*3C allele and genotype frequencies differ significantly across the self-reported ethnic groups, mainly in Brazilians [29].

CYP3A5*1D allele in non-African-descent individuals (04.0%) was lower than that found in Caucasian individuals from Europe (92 to 96%; $p<0.001$) [10,15]. However, in the African-descent individuals, CYP3A5*1D allele frequency (55.2%) is in agreement to previously published data for this ethnic group (26 to 54%, $p=0.112$) [14,15]. These differences in allele frequencies when compared to other populations may result from the characteristics of the Brazilian population, which is known to undergo an ethnic admixture (tri-hybrid population with African, European and Amerindian ancestral roots), as previously reported [29], as well as the size of this sample which causes the power of the statistical test to be below the desired level.

The linkage between CYP3A5*3C and CYP3A5*1D SNPs found in this sample confirms that CYP3A5*1D is strongly associated to CYP3A5*3C as previously suggested [10,14]. CYP3A5*1D nucleotide change has been involved in mRNA destabilization processes in the 3' untranslated region (3'UTR), and this could be a potential explanation for low expression of CYP3A5 mRNA in individuals carrying this variant [14].

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

Fig. 1. Influence of the *CYP3A5**3A allele on serum lipids in non-Africans. Individual values (mean $\pm$ SD) before and after 10 mg atorvastatin/day/4 weeks treatment for (A) total cholesterol, (B) LDL-cholesterol, and (C) HDL-cholesterol. Individual % changes and mean values (lines) after treatment for (D) total cholesterol, (E) LDL-cholesterol and (F) HDL-cholesterol.

Frequency of the rare *CYP3A5**6 allele in African-descent HC individuals was similar to that found in other African populations (8.6 to 15.2%, $p > 0.05$) [15]. We did not find this allele in non-African-descent individuals. Other studies have reported very low frequency of *6 allele (<1%) in Caucasian populations [15,20].

4.2. *CYP3A5* SNPs and response to atorvastatin

The lack of relationship of the *CYP3A5**3C and baseline serum levels of lipids was also reported in other European populations [16]. Analysis of the interaction between *CYP3A5**3C SNP and response to atorvastatin demonstrates that the *CYP3A5**3C allele was associated with lower reduction of total, LDL- and HDL-cholesterol in non-African-derived patients. These results are different from the previous findings in a study with 46 European individuals, in which total and LDL-cholesterol were more reduced for *CYP3A5**3/*3 after 1 y treatment with lovastatin, simvastatin or atorvastatin [16]. Conversely, no significant associations were observed between the *CYP3A5**3C allele variant and response to simvastatin [18] after 2 and 6 months of treatment in another Brazilian population, or fluvastatin [16] after 1 y, or pravastatin [16,19] after 24 weeks treatment in European-derived populations. The different findings between these studies may be due to differences in metabolism pathway of the different statins. It is noteworthy that fluvastatin is mainly metabolized by *CYP2C9*, therefore variants in *CYP3A5* may have a minor effect on fluvastatin bioavailability [31]. Moreover, pravastatin is not extensively metabolized by *CYP3A4* or any other CYP [31] while atorvastatin is exclusively metabolized by *CYP3A4/3A5* at phase 1 [5].

The smaller reduction of serum HDL-cholesterol after atorvastatin treatment, found in non-African carriers of *CYP3A5**3C and *1D alleles was described for the first time in this study. This result suggests that *CYP3A5**3C and *1D alleles are associated with a better HDL-cholesterol response to atorvastatin. In statins monotherapies there is a huge heterogeneity on HDL-cholesterol response and it is expected that one third of patients will present HDL-cholesterol reduction [32], though in most cases it is expected that HDL-cholesterol will increase or remain unaltered with statin treatment [33,34].

Differences among this and other studies are suggestive that the relationship between *CYP3A5**3C allele and response to statins may depend on the kind of statin, period of treatment, ethnicity and other variables. Moreover, factors affecting pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins should be considered [31]. Another important aspect is that statins effects do not always correlate with serum levels of the drug and its active metabolites [6]. This fact is not a surprise, taking into account that the liver is the main site of action of HMGCR, hepatic levels of statins and its active metabolites better correlate with pharmacological effects on plasma LDL-cholesterol. Unfortunately, intracellular data are difficult to obtain, given the complex interplay among processes such as plasma proteins and liver tissue binding, hepatic uptake, intracellular metabolism and bile secretion [6]. And at last, but not least, there are several ethics issues to consider when obtaining liver samples for scientific studies with statins.

It is possible to infer that carriers of the two functional enzymes *CYP3A4* and *CYP3A5* (*CYP3A4**1A and *CYP3A5**1A alleles) produce more atorvastatin active metabolites than other genotype individuals. It has been reported that about 70% of the circulating inhibitory activity for HMGCR is attributable to these active metabolites [6]. In that way, HMG-CoA reductase inhibition is potentialized by the higher rate of atorvastatin biotransformation, especially in hepatocytes. Therefore, carriers of *CYP3A5**1A allele should present a better hypolipidemic response to atorvastatin than carriers of *CYP3A5**3C allele, as observed in this study.

It has been found that *CYP3A5**3C has ten variants that are assumed to be associated with low expression of the *CYP3A5* protein, however functional consequences of some of these variants still remain to be investigated [33]. Therefore, the presence of *CYP3A5**3C alone may not be sufficient to correlate with *CYP3A5* phenotype [35].

The sample used in this study may have contributed to the results found by our group, since individuals grouped by ethnicity show significant differences ($p < 0.05$) on hypertension, menopausal status, use of other medications despite hypolipemiant drugs, baseline profile of HDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglycerides.

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, *CYP3A5**3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, Clin Chim Acta (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

ARTICLE IN PRESS

6

M.A.V. Willrich et al. / Clinica Chimica Acta xxx (2008) xxx–xxx

The strong association between CYP3A5*3C and CYP3A5*1D found in this study was firstly reported by Lee et al. [14]. The lower response to atorvastatin found in CYP3A5*3A allele carriers from our study may also result from the interaction with variants of other genes involved in the biotransformation and elimination of atorvastatin.

It is well known that atorvastatin disposition is affected by genetic variation in a multitude of complex processes in which the CYP3A5 is involved. It is noteworthy that the balance between oxidative and conjugative routes of metabolism and differential tissue distribution via membrane transporters is likely to affect the overall clinical efficacy of the atorvastatin [36].

Interestingly, serum apoA1 was significantly increased by atorvastatin in African-descent individuals carrying the CYP3A5*1A allele, even though CYP3A5 variants did not influenced the serum lipids after treatment with atorvastatin in this group. The lower frequency of the non-functional CYP3A5*3A allele in African-derived population may contribute to the lack of the relationship between this allele and lowering response to atorvastatin. Moreover, the small number of African-descent individuals included in the study may also reduce the power of statistical tests.

CYP3A5*6 variant leads to the skipping of part of exon 7 in CYP3A5 transcripts, that could have an impact over the amount of CYP3A5 protein produced [15] and therefore of atorvastatin metabolism. However, in our sample it was found only in heterozygosis and no effect on response to atorvastatin treatment was found.

Other factors such as gender, hypertension, concomitant medication, or variables may interfere with the results from this study, as previously published [31,35,37]. However, association between these variables and atorvastatin response was not found in our study. The interaction between CYP3A5*3C allele and the magnitude of serum CK elevation in patients experiencing myalgia found in an American population [36] was not shown in our study. It is noteworthy that the HC individuals of our sample were not concomitantly taking gemfibrozil which is known to cause severe muscle damage and increase on serum CK [36]. Moreover, our study is a short-term treatment (4 weeks) and side effects of atorvastatin treatment may start a few weeks from the beginning of the conduct or even 2 y later [5]. In conclusion, the results from this study are suggestive that CYP3A5*3A allele may be associated with reduced serum cholesterol response to atorvastatin in non-African individuals.

Acknowledgements

This study was supported financially by grants from FAPESP (Projects 2000/12224-0 and 2003/02086-8). We thank Claudia Villazon and Raquel de Oliveira for the excellent support during patient selection. M.A.V. Willrich, F.D.V. Genvigir, S.S. Arazi and A.C. Rodrigues are recipients of fellowships from FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil. M.H. Hirata and R.D.C. Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brasília, DF, Brazil.

References

- [1] Vaughan CJ, Gotto Jr AM. Update on statins: 2003. *Circulation* 2004;110:886–92.
- [2] Brown MS, Goldstein JL. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. *Atheroscler Suppl* 2004;5:57–9.
- [3] Stein EA. Managing dyslipidemia in the high-risk patient. *Am J Cardiol* 2002;89:50C–7C.
- [4] Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins. *Circulation* 2004;109S3:50–7.
- [5] Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1141–60.
- [6] Bogman K, Peyer AK, Torok M, Kusters E, Drewe J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *Br J Pharmacol* 2001;132:1183–92.
- [7] Wojnowski L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans. *Ther Drug Monit* 2004;26:192–9.
- [8] Siest G, Marteau JB, Maumus S, Berrahmoune H, Jeannesson E, Samara A, et al. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol* 2005;527:1–22.

- [9] Rodrigues AC, Hirata MH, Hirata RD. The genetic determinants of atorvastatin response. *Curr Opin Mol Ther* 2007;9:545–53.
- [10] Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001;11:773–9.
- [11] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383–91.
- [12] Fukuen S, Fukuda T, Maune H, Ikenaga Y, Yamamoto I, Inaba T, et al. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 2002;12:331–4.
- [13] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1271–94.
- [14] Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* 2003;13:461–72.
- [15] Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004;5:243–72.
- [16] Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004;14:523–5.
- [17] Wilke RA, Moore JH, Burmester JK. Relative impact of CYP3A genotype and concomitant medication on the severity of atorvastatin-induced muscle damage. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:415–21.
- [18] Fiegenbaum M, da Silveira FK, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira MT, Pires RC, et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:551–8.
- [19] Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton Jr VP, Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 2004;291:2821–7.
- [20] Gervais C, Vézina S, Caciha C, Carrillo JA, Benitez J. Differences in CYP3A5*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and other Caucasian populations. *Ther Drug Monit* 2005;27(6):819–21.
- [21] Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH, Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1389–97.
- [22] Sorkin SC, Forestiero FJ, Hirata MH, Guzman EC, Cavalli SA, Bertolami MC, et al. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1339–45.
- [23] Genvigir FD, Soares SA, Hirata MH, Willrich MA, Arazi SS, Rebecchi IM, et al. Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. *Clin Chim Acta* 2008;389:79–86.
- [24] Chahoud G, Aude YW, Mehta JL. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? *Am J Cardiol* 2004;94:1260–7.
- [25] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [26] Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998;44:1740–50.
- [27] Yoo J, Seo B, Kim Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W483–8.
- [28] van Schaik RH, van der Heiden JP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002;48:1668–71.
- [29] Suarez-Kurtz G, Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SDJ, Struchiner C. Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A4*3 polymorphism. *Pharmacogenomics* 2007;8(10):1229–306.
- [30] Lee SJ, Goldstein JA. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics* 2005;6:357–71.
- [31] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19(1):117–25.
- [32] Asztalos BF. High density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:385–91.
- [33] Schmitz G, Drobnik W. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol-lowering therapy. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(4):581–9.
- [34] Simon JA, Lin F, Hulley SB, Blanche PJ, Waters D, Shidorski S, et al. Phenotypic predictors of response to simvastatin therapy among African-Americans and Caucasians: the Cholesterol and Pharmacogenetics (CAP) Study. *Am J Cardiol* 2006;97(6):843–50.
- [35] Givens RC, Lin YS, Dowling AL, Thummel KE, Lamba JK, Schuetz EG, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* 2003;95:1297–300.
- [36] Wilke RA, Reif DM, Moore JH. Combinatorial pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:911–8.
- [37] Ho H, Fujio A, Hall SD, Flockhart DA, Li L, Skarab TC, et al. Association between the CYP3A5 genotype and blood pressure. *Hypertension* 2005;4(5):294–8.
- [38] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000>.

Please cite this article as: Willrich MAV, et al, CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia, *Clin Chim Acta* (2008), doi:10.1016/j.cca.2008.07.032

SPECIAL REPORT

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Statin regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression

CYP3A4 and CYP3A5 are cytochrome P450 enzymes that are highly expressed in the liver and gut and metabolize endogenous compounds and xenobiotics. Statins are cholesterol-lowering drugs that are extensively metabolized by CYP3A4 and CYP3A5. The bioavailability of statins is affected by CYP3A4 and CYP3A5 and glucuronidases metabolism as well as uptake and efflux transporters that affect drug disposition. CYP3A4 and CYP3A5 variants have been demonstrated to influence the pharmacokinetics, efficacy and safety of statins. Inducers and inhibitors of CYP3A4 and CYP3A5 play an important role in reducing statin efficacy and increase the risk of adverse effects, respectively. Statins have been demonstrated to increase CYP3A expression *in vitro*, most likely because they are ligands to nuclear receptors (pregnane X receptor and constitutive androsteroe receptor) that form heterodimers with retinoid X receptors and bind to responsive elements in the CYP3A4 and CYP3A5 promoter regions. This special report outlines the earlier studies on variability of response to statins owing to CYP3A variants and highlights findings on the induction of CYP3A4 and CYP3A5 expression by statins.

KEYWORDS: CYP3A4 CYP3A5 gene expression pharmacogenomics SNPs statins

CYP3A4 & CYP3A5: function & variants

Cytochrome P450 (CYP) 3A4 and 3A5 belong to a subfamily of enzymes that are highly expressed in the liver, gastrointestinal tract and kidney that metabolize a large number of chemically unrelated xenobiotics through hydroxylation, oxidation and reduction reactions [1]. A recent study demonstrated that CYP3A4 and CYP3A5 metabolize 37% of the 200 most consumed drugs on the US market [2].

Besides the mediation of Phase 1 drug biotransformation, CYP3A4 and CYP3A5 are involved in the metabolism of cholesterol, steroid hormones and other lipids that are important in intracellular signaling pathways [3]. A reviewed list of CYP biotransformation reactions and substrates was compiled by Brown *et al.* [1].

Variants in the CYP3A4 and CYP3A5 genes have been associated with differences in gene expression in the liver [4–6] and a differential response to several drugs, such as tacrolimus, verapamil and saquinavir [7–10]. The most relevant variants of these genes are CYP3A4*1B (rs2740574) and CYP3A5*3C (rs776746). An updated list of all CYP gene polymorphisms can be found online at the homepage of the Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee [101].

CYP3A4*1B is located at the 5' promoter region of the CYP3A4 gene (–392 A>G) at a nifedipine-specific element [2]. Data from the dbSNP database

[102] indicates that this variant has a low frequency in Caucasian populations (2.3–2.5%) but a much higher frequency among African-Americans or African populations, ranging from 68 to 82%. In Brazilian populations, this variant was found at frequency of 3–13.3% [11–13].

CYP3A5*3C (A6986G) is a genomic transition within intron 3 that generates an abnormally spliced mRNA, resulting in a nonfunctional truncated CYP3A5 protein [2]. It has been demonstrated that the *3C variant frequency is highly variable among different ethnic groups [2], such as European Caucasians (94–97%), Asian and Hispanic populations (66–75%) and African-Americans (12–37%) [102]. In Brazil, in individuals with European ancestry, the frequency of the *3C allele is similar to that in other Caucasian populations (76–91%) [12,14,15]. CYP3A5*1D (rs17161788) is a SNP located at the CYP3A5 3'-UTR, which is in strong linkage disequilibrium with CYP3A5*3C. The presence of both the *3C and *1D alleles defines the CYP3A5*3A allele [101], which has a frequency similar to the CYP3A5*3C allele in all the populations studied [15,102].

Role of CYP3A4 & CYP3A5 on statin pharmacokinetics

Statins are potent cholesterol-lowering drugs that inhibit the microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR),

Maria Alice Vieira Willrich¹, Mario Hiroyuki Hirata & Rosario Domínguez Crespo Hirata

¹Author for correspondence: Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenue Prof. Lineu Prestes, 580, B17, 05508-05900 São Paulo, SP, Brazil
Tel.: +55 113 091 3660;
Fax: +55 113 813 2197;
malicewi@usp.br

future
medicine part of fsg

the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis [16]. Moreover, statins reduce the production of intermediate metabolites, such as isoprenoids that are involved in cell growth and differentiation, inflammation and endothelial function [17]. Several clinical trials have demonstrated that statins reduce the risk of cardiovascular disease, and nowadays, these drugs are prescribed for diseases other than hypercholesterolemia. Statins are being considered for diabetes therapy, particularly in the early stages of the disease, given that statins have demonstrated beneficial effects on diabetic-induced oxidative stress and nephropathy [18].

There are several types of statins, including lovastatin, pravastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, and most recently, pitavastatin and rosuvastatin.

Simvastatin and lovastatin are ingested as highly lipophilic lactone prodrugs, while other statins are administered as active acid forms [19]. Atorvastatin and lovastatin are primarily metabolized by *CYP3A4* and *CYP3A5* in the gut and liver [1,2]. Simvastatin is mainly metabolized by *CYP3A4* and *CYP3A5*, but also by *CYP2C8* to a lesser extent. Rosuvastatin and fluvastatin are metabolized by *CYP2C9* [19]. The relative contributions of *CYP3A4* and *CYP3A5* to the overall metabolism of statins were recently investigated in liver samples of 14 donors [20]. *CYP3A4* was estimated to be responsible for 85% of the atorvastatin metabolism in liver microsomes, whereas *CYP3A5* accounts for less than 15%. However, the impact of the *CYP3A5*3C* variant on the biotransformation of atorvastatin was not evaluated.

Pitavastatin and pravastatin interact minimally with metabolizing enzymes, are largely excreted unchanged by the kidneys and are less likely to be affected by genetic variations in metabolizing enzymes [21].

After CYP oxidation reactions, statins are conjugated by glucuronidases, such as UGT1A1 and 1A3, which produce acyl-glucuronide metabolites that seem to have a minor impact on the clearance of statins [19]. Acid forms of simvastatin, lovastatin, atorvastatin and pitavastatin are also substrates of P-glycoprotein, a membrane transporter of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family encoded by the *ABCB1* gene [19].

P-glycoprotein (*ABCB1*) and other members of the ABC transporters family promote the efflux of statins, mainly in the intestine and liver, regulating the intracellular content with a significant impact on drug response [19,21].

It has also been demonstrated that pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin and atorvastatin are high-affinity substrates to the uptake transporters *SLCO1B1* and *SLCO2B1* from the solute-carrier (SLC) family [19,22]. These transporters are involved in hepatic and intestinal uptake and facilitate translocation of the drug into the cell.

Pharmacogenetic factors, for instance, gene polymorphisms found in *CYP3A* enzymes and/or uptake and efflux transporters, can cause interindividual variability in statin disposition [15,23,24] and hence, affect its efficacy and safety.

Role of *CYP3A4* & *CYP3A5* in statin response & safety

Variants in genes involved in cholesterol biosynthesis, lipoprotein secretion and lipoprotein clearance metabolism have been associated with the differential response to statins, including HMGCR. The most frequently studied are apolipoprotein E (APOE), cholesterol ester transfer protein (CETP) and low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR). Results of these and other relevant pharmacogenomic studies can be found in the following references [21,23,25–29].

In vivo studies have described the influence of *CYP3A* SNPs on the cholesterol-lowering response to statins. The *CYP3A4*1B* variant was significantly associated with higher levels of post-treatment LDL-cholesterol in hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin [30]. However, other recent studies, including studies in two different Brazilian populations on atorvastatin and simvastatin treatment, could not replicate these results [12,13,31].

To date, there is no clear genotype–phenotype association regarding *CYP3A4*. Because of this, a consensus is building that human variation in *CYP3A4* activity is caused by regulatory polymorphisms rather than structural polymorphisms in *CYP3A4* gene [32].

We have recently demonstrated that hypercholesterolemic individuals carrying the *CYP3A5*3A* allele have a reduced response to atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) [15]. These results are different to the previous findings of a study with 46 European individuals, in which total and LDL-cholesterol were lower in *CYP3A5*3C/*3C* individuals after 1 year of treatment with lovastatin, simvastatin or atorvastatin [33]. Conversely, no significant associations were observed between the *CYP3A5*3C* allele and response to simvastatin [12] after 2 and 6 months of treatment in another Brazilian population.

Clinical response to statin-mediated reduction of lipid and lipoprotein parameters is highly variable. Nearly a third of statin-treated patients do not meet their lipid-lowering goals [21].

In addition, adverse drug reactions (ADRs), such as muscle damage (weakness, fibromyalgia, myopathy or rhabdomyolysis) and hepatotoxicity, although rare (1–5%), can be severe [21,34,35]. Given the exceptional number of patients treated with statins, the occurrence of ADRs in real terms are considerable and serious enough to cause public concern [21].

Risk and severity of ADRs are related to the magnitude and duration of systemic exposure to statins, which are susceptible to any source of variation in pharmacokinetic parameters, including nongenetic factors (tobacco, nutrition or concomitant medications) or polymorphisms in the genes involved in the pharmacokinetic handling of statins. In fact, Wilke *et al.* examined 68 cases of statin-induced myopathy and identified that severity of muscle damage, measured by creatine kinase (CK) serum levels, was associated with having two copies of the *CYP3A5**3A allele [36].

Owing to the large versatility of the *CYP3A* subfamily enzymes and their extensive list of substrates, inhibitors and inducers [1,2], it is essential to consider drug interactions when prescribing more than one medication metabolized by the *CYP3A* system.

Metabolism of statins may be impaired if *CYP3A* inhibitors, such as itraconazole, gemfibrozil or warfarin, are concomitantly taken. Gemfibrozil, a fibrate also used in hyperlipidemia treatment, increases the plasma levels of most statins. Statins and gemfibrozil can also interact with oral anticoagulants, such as warfarin [19,36]. In this case, statins levels will significantly increase in the bloodstream, exposing the patient to severe ADRs [37]. On the other hand, *CYP3A* inducers, such as rifampin or phenobarbital, increase the metabolic rate of the statins reducing the efficacy of these cholesterol-lowering drugs [19].

Statins that are substrates of *CYP3A4* and *CYP3A5* (lovastatin, atorvastatin and simvastatin) have the greatest potential for interacting with drugs known to inhibit the *CYP3A* system, increasing the concentrations of the substrate and the potential for drug interactions.

Effects of statins on *CYP3A4* & *CYP3A5* expression

CYP3A4 and *CYP3A5* expression in the liver exhibit wide interindividual variation [4–6]. Because this variation severely affects the efficacy

and toxicity of drugs, assessment and prediction, as well as monitoring of the expression levels of *CYP3A4* and *CYP3A5*, are important for patients undergoing drug therapy.

An increase in *CYP3A* mRNA expression owing to the presence of statins has already been described. Kocarek *et al.* reported that treatment of hepatocytes isolated from three liver donors with simvastatin, lovastatin, fluvastatin or atorvastatin increased the amount of *CYP3A* mRNA [38]. *CYP3A* protein levels were also increased by statins, ranging from six- to 20-fold from the basal level. However, *CYP3A4* and *CYP3A5* transcripts could not be differentiated by northern blot.

In vitro studies with liver samples have described a strong concordance between baseline *CYP3A4* mRNA levels and *CYP3A4* protein content [39,40]. Takagi *et al.* also found that pregnane X receptor (*PXR*) mRNA levels are correlated with *CYP3A4* mRNA and protein levels in human liver tissue [40]. On the other hand, *CYP3A5* mRNA and protein levels are strongly linked to the *CYP3A5**3C variant, as demonstrated in human liver and intestine samples [5,6]. According to Lin *et al.*, absence of the variant is correlated with higher levels of *CYP3A5* mRNA and protein expression [6]. When the *CYP3A5**1A allele was present, *CYP3A5* significantly contributed to the total *CYP3A* protein content [5,6].

Figure 1. Basal *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA expression in HepG2 cells. *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA levels are shown as relative expression compared with GAPDH mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). *CYP3A4* is 18.5-times more expressed than *CYP3A5* ($p < 0.001$) compared by t-test. * $p < 0.001$.

Figure 2. Effect of atorvastatin treatment on normalized *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA expression. *CYP3A4* and *CYP3A5* mRNA levels are shown as relative expression to *GAPDH* mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). (A) After 12-h treatment. (B) After 24-h treatment. Groups were compared by one-way analysis of variance, followed by Dunnett's Multiple Comparison Test. Data are presented as mean (bars) and standard deviation (lines). * $p < 0.05$.

A recent study by our group demonstrated that *CYP3A4* mRNA was approximately 18-times more expressed than *CYP3A5* in HepG2, a human-hepatocarcinoma-derived cell line [41] (FIGURE 1). Moreover, *CYP3A4* mRNA expression increased up to ten-times when HepG2 cells were incubated with 20 μ M atorvastatin for 12 h ($p = 0.006$) (FIGURE 2A). *CYP3A4* mRNA remained upregulated by atorvastatin in 24-h treatment experiments: *CYP3A4* mRNA expression was significantly increased for 1 μ M ($5.69 \pm 0.99 \mu$ M), 10 μ M ($8.44 \pm 0.50 \mu$ M) and 20 μ M ($5.08 \pm 1.89 \mu$ M) compared with methanol ($1.00 \pm 0.28 \mu$ M), $p < 0.01$. *CYP3A5* mRNA expression was also increased up to four-times from the baseline concentration when 20 μ M atorvastatin was used in a 12-h treatment

($p = 0.001$) (FIGURE 2B). Atorvastatin treatment over 24 h did not affect *CYP3A5* mRNA expression independently of the doses ($p > 0.05$). These results suggest that *CYP3A4* demonstrates a stronger and longer induction by atorvastatin.

Several pathways contribute to the regulation of CYP3A enzymes transcription. The molecular mechanism is complex and its regulation is affected by a number of nuclear receptors, including PXR, retinoid X receptors (RXR), constitutive androsteroic receptor (CAR), glucocorticoid receptor and vitamin D receptor [5]. PXR is a promiscuous receptor that is activated by a wide variety of xenobiotics and endogenous compounds [42]. Lovastatin and atorvastatin are described as PXR ligands [43,44], and Kokayashi *et al.* also identified statins as activators of CAR [45].

PXR is the most extensively studied nuclear receptor known to enhance *CYP3A4* transcription, followed by CAR [46]. Ligand-activated PXR forms a heterodimer with RXR (PXR–RXR), which interacts with PXR responsive elements (PXRE) located in the *CYP3A4* proximal promoter and in the xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) region, which is located 8 kb upstream. Cooperation between the proximal promoter and distal XREM is central to the PXR-mediated *trans*-activation of *CYP3A4* [47] (FIGURE 3). Considering that CAR

shares the same responsive elements as PXR, interplay between nuclear receptors is likely to be a significant factor in *CYP3A4/CYP3A5* regulation [46].

Studies have demonstrated that PXR is activated by a number of *CYP3A4/CYP3A5* inducers [47,48]. It is noteworthy that *CYP3A4* is more inducible by xenobiotics than *CYP3A5* [49]. In some situations, *CYP3A5* activation can be regarded as negligible [49]. The 5'-UTR of *CYP3A5* contains the proximal PXRE but it lacks the distal XREM [46,47,50] and could explain

Figure 3. Hypothetical *CYP3A4* and *CYP3A5* transcription activation process, modulated by activated PXR–RXR or CAR–RXR heterodimers. Statins are ligands for PXR and CAR, and this might contribute to the increase in *CYP3A* mRNA expression. *CYP3A4* has two binding sites for heterodimers (PXRE and XREM), while *CYP3A5* has only one binding site (PXRE). This difference might explain the minor atorvastatin induction observed for *CYP3A5* when compared with *CYP3A4*. CAR: Constitutive androsteroe receptor; PXR: Pregnane X receptor; PXRE: PXR responsive elements; RXR: Retinoid X receptors; XREM: Xenobiotic-responsive enhancer module.

SPECIAL REPORT Willrich, Hirata & Hirata

the poorer induction of *CYP3A5* mRNA when compared with *CYP3A4*, supported by findings in human hepatic and intestinal cells [48] and the HepG2 cell line [41,51].

Statins are ligands to nuclear receptors, such as PXR and CAR, that modulate *CYP3A4* and *CYP3A5* transcription. Hence, alterations in *CYP3A4* and *CYP3A5* responsive elements may contribute to differences observed in mRNA and protein expression that in turn, contribute to the variability of pharmacological response to statins treatment.

Conclusions & future perspective

Few enzymes are more striking in both versatility and in number of substrates than those in the CYP3A enzyme system. Their ubiquitous presence, paired with their broad substrate selectivity, suggests that their role in biotransformation is essential to an organism's ability to adapt to its environment [1]. Recognizing the effects of statins on *CYP3A4* and *CYP3A5* expression is vital to better understand the wide interindividual variability in pharmacokinetics and response to treatment. Moreover, it is common that subjects undergoing statin treatment are also taking other concomitant medications, and, as explained earlier, drug interactions affecting efficacy or safety of the

overall treatment may occur. Drug toxicity and treatment outcome depend on many genetic and nongenetic factors. Haplotype studies, multi-gene and multifactorial approaches are needed to achieve an overall improvement in pharmacological therapy, which means minimizing risks of ADRs while increasing efficacy. It will be essential to comprehend regulation and signaling mechanisms that up- or down-regulate genes. This is the challenge for the years to come, and succeeding might enhance the possibilities of applying *CYP3A4* and *CYP3A5* as genomic and proteomic biomarkers.

Acknowledgements

This article is dedicated to the memory of Dr Verner Willrich

Financial & competing interests disclosure

Maria Alice V Willrich is a recipient of a fellowship from FAPESP, Sao Paulo, Brazil. Mario H Hirata and Rosario DC Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brazil. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

CYP3A4 & CYP3A5: function & variants

- * CYP3A4 and CYP3A5 are important drug metabolizing enzymes that metabolize 37% of the 200 most consumed drugs on the US market.
- * CYP3A4 and CYP3A5 have several important SNPs, such as *CYP3A4*1B* and *CYP3A5*3C*.

Role of CYP3A4 & CYP3A5 on statin pharmacokinetics

- * Statins are competitive inhibitors of the microsomal 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, and are widely used as cholesterol-lowering drugs. Their effects go beyond decreasing cholesterol levels. Statins also have powerful pleiotropic effects that diminish cardiovascular risk.
- * CYP3A4 and CYP3A5 contribute to statin pharmacokinetics in Phase I oxidation reactions. Glucuronidases (UGT1A1 and 1A3), uptake transporters (SLCO1B1 and SLCO2B1) and efflux transporters (ABCB1) might also participate in statins disposition.

Role of CYP3A4 & CYP3A5 on statin response & safety

- * CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms have been associated with variability in statin response.
- * Concomitant medicines that undergo metabolism in the CYP3A system and other environmental factors, such as nutrition and tobacco, may also contribute to the variability in statins response.
- * CYP3A inducers increase the metabolic rate of the statins reducing the efficacy of these cholesterol-lowering drugs.
- * CYP3A inhibitors may impair statins biotransformation, increasing the plasma levels and exposing the individual to severe adverse reactions.

Effects of statins on CYP3A4 & CYP3A5 expression

- * Statins induce *CYP3A* mRNA and protein expression in different cell models.
- * Statins are ligands for nuclear receptors, such as pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, that form heterodimers with retinoid X receptor and bind to responsive elements in the *CYP3A4* (xenobiotic-responsive enhancer module and pregnane X receptor responsive elements) and *CYP3A5* (pregnane X receptor responsive elements) promoter regions.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

* of interest

** of considerable interest

- 1 Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN: Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab. Rev.* 40(1), 1–100 (2008).
- * **Structure-based outline of CYP-catalyzed biotransformations.**
- 2 Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M: Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* 392(6), 1093–1108 (2008).
- ** **Summary of the functional polymorphisms and aspects of functional genomics of the major CYPs and their clinical significance.**
- 3 Wang K, Chen S, Xie W, Wan YJ: Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. *Biochem. Pharmacol.* 75(11), 2204–2213 (2008).
- 4 Kuehl P, Zhang J, Lin Y *et al.*: Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* 27, 383–391 (2001).
- 5 Koch I, Weil R, Wolbold R *et al.*: Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab. Dispos.* 30(10), 1108–1114 (2002).
- 6 Lin YS, Dowling LS, Quigley SD *et al.*: Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* 62(1), 162–171 (2002).
- 7 Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP *et al.*: Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the *MDR-1*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* genes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76(6), 545–556 (2004).
- 8 Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E: Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics* 8(7), 835–849 (2007).
- 9 Jin Y, Wang YH, Miao J *et al.*: Cytochrome P450 3A5 genotype is associated with verapamil response in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82(5), 579–585 (2007).
- 10 Josephson F, Allqvist A, Janabi M *et al.*: CYP3A5 genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81(5), 708–712 (2007).
- 11 Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RDC: Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin. Chem.* 47(2), 348–351 (2001).
- 12 Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR *et al.*: The role of common variants of *ABCB1*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 551–558 (2005).
- 13 Cavalli SA, Rebecchi IMM, Matsumoto LO *et al.*: Lowering cholesterol response to atorvastatin is not influenced by CYP3A4*1B. *Biofarma* 3(6), 29–35 (2008).
- 14 Suarez-Kurtz G, Perini JA, Bastos-Rodrigues L, Pena SD, Struchiner C: Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5*3 polymorphism. *Pharmacogenomics* 8(10), 1299–1306 (2007).
- 15 Willrich MAV, Hirata MH, Genvigir FD *et al.*: CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta* 398(1–2), 15–20 (2008).
- 16 Vaughan CJ, Gotto AM Jr: Update on statins: 2003. *Circulation* 110, 886–892 (2004).
- 17 Liao JK, Laufs U: Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 89–118 (2005).
- 18 Danesh FR, Kanwar YS: Modulatory effects of HMG-coA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J.* 18, 905–915 (2004).
- 19 Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT: Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80(6), 565–581 (2006).
- ** **Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins, as well as the potential drug interactions.**
- 20 Park JE, Kim KB, Bac SK, Moon BS, Liu KH, Shin JG: Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica* 38(9), 1240–1251 (2008).
- 21 Mangravite LM, Thorn CN, Krauss RM: Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. *Pharmacogenomics* 6(6), 360–374 (2006).
- ** **Review on the candidate genes that affect the pharmacogenomics of statin treatment.**
- 22 Grube M, Köck K, Oswald S *et al.*: Organic anion transporter polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80(6), 607–620 (2006).
- 23 Rodrigues AC, Hirata MH, Hirata RDC: The genetic determinants of atorvastatin response. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9(6), 545–553 (2007).
- ** **Review discussing pharmacodynamic and pharmacokinetic candidate genes that affect the atorvastatin lipid-lowering response.**
- 24 Kim KA, Park PW, Lee OJ, Kang BS: Effect of polymorphic CYP3A5 genotype on the single-dose simvastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 87–93 (2007).
- 25 Salazar LA, Cavalli SA, Hirata MH *et al.*: Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(11), 1301–1304 (2000).
- 26 Guzmán EC, Hirata MH, Quintão FC, Hirata RDC: 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.* 38(8), 731–736 (2000).
- 27 Sorkin SC, Forcstero FJ, Hirata MH *et al.*: APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 1339–1345 (2005).
- 28 Arazí SS, Genvigir FD, Willrich MA *et al.*: Atorvastatin effects on *SREBF1a* and *SCAP* gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. *Clin. Chim. Acta* 393(2), 119–124 (2008).
- 29 Genvigir FD, Soares SA, Hirata MH *et al.*: Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. *Clin. Chim. Acta* 389, 79–86 (2008).
- 30 Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, Schaefer EJ: CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* 93, 104–107 (2004).
- 31 Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP Jr, Ridker PM: Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 291(23), 2821–2827 (2004).
- 32 Schuetz EG: Lesson from the CYP3A4 promoter. *Mol. Pharmacol.* 65(2), 279–281 (2004).
- * **Summary of previous work concerning CYP3A4 regulation.**
- 33 Kivistö KT, Niemi M, Schaeffeler F *et al.*: Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 14, 523–525 (2004).
- 34 Bellosa S, Paoletti R, Corsini A: Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 109(23 Suppl. 1), III50–III57 (2004).

200 First Street SW
Rochester, MN 55905
507-284-2511

Linnea M. Baudhuin, Ph.D.
Department of Laboratory Medicine
and Pathology
507-538-0078

July 13, 2011

To Whom It May Concern:

Maria Alice Vieira Willrich has had an appointment as a Research Trainee at the Nucleotide Polymorphism Laboratory, Mayo Clinic Rochester, MN, USA, from May 9th to August 5th, 2011.

The Nucleotide Polymorphism Laboratory (NPL) is a clinical molecular genetics laboratory in the Department of Laboratory Medicine and Pathology at the Mayo Clinic in Rochester, MN. The NPL is directed by 3 Staff Consultants (Drs. L. M. Baudhuin, D. J. O'Kane, and J.L. Black, III). The NPL is staffed by a General Supervisor (A. Barthel) who oversees the day to day operation of the laboratory; a Quality Assurance Specialist; an Education Specialist; 2 Technical Specialists who function in troubleshooting existing assays and problematic samples; 7 Development Technologists who produce new pharmacogenetic and molecular genetic tests for clinical use and also assist the Technical Specialists; and 6 Clinical Technologists who perform the clinical testing. Currently, the NPL test menu includes over 30 different assays related to pharmacogenetic and molecular genetic testing.

During her research trainee rotation in our laboratory, Maria Alice has worked on research projects under Dr. Baudhuin's supervision, which included:

- 1) Statin intolerance and statin efficacy: identifying genetic variants in study participants with techniques including Real-time TaqMan Genotyping assays and Full Gene Sequencing.
- 2) Characterization of the *ACTA2* gene and its involvement in familial aneurysms and connective tissue disorders; Maria has run samples for *ACTA2* sequencing reactions and analyzed the results for variants.
- 3) A Cardiovascular Genetics Panel for detection of 56 genes involved with CVD is being developed for next generation sequencing, and Maria Alice has designed primers for verification of those results with Sanger sequencing for the *MYH6* and *MYH7* genes.
- 4) Validation of *SLCO1B1**1b and *5 TaqMan genotyping assays for clinical use in EDTA and saliva samples, and genotyping 75 hyperbilirubinemia patients for the *SLCO1B1* variants.

Maria Alice has also had the opportunity to attend several laboratory meetings and presented a talk to laboratory staff about Personalized Medicine in Brazil, highlighting the published work by her research group at the University of São Paulo. Maria has also had the opportunity to view our laboratory clinical testing processes as well as clinical testing processes in other Mayo laboratories.

Sincerely yours,

Linnea Baudhuin, Ph.D., DABMG
Co-director, Nucleotide Polymorphism Laboratory
Co-director, Cardiovascular Laboratory Medicine
Hilton 402B
Mayo Clinic
200 First St SW
Rochester, MN 55905
Phone: 507-538-0078
Fax: 507-266-4176
E-mail: baudhuin.linnea@mayo.edu

8. ANEXOS

Anexo 1.	Ficha do Aluno	131
Anexo 2.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	134

Anexo 01. Ficha do Aluno

Ficha do Aluno	https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf
<div><div> Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação</div><div> </div></div> <div><div>Universidade de São Paulo</div><div>Faculdade de Ciências Farmacêuticas</div><div>FICHA DO ALUNO</div></div>	
<hr/>	
9136 - 5255810/2 - Maria Alice Vieira Willrich	
Email:	malicevi@usp.br
Data de Nascimento:	24/04/1981
Cédula de Identidade:	RG - 2.836.888-6 - SC
Local de Nascimento:	Estado de Santa Catarina
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina - Brasil - 2002
Mestrado:	Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006
<hr/>	
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	16/04/2007
Início da Contagem de Prazo:	16/04/2007
Data Limite:	14/08/2011
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Rosario Dominguez Crespo Hirata - 16/04/2007 até o presente. E.Mail: rosariohirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 16/04/2007
Prorrogação:	120 dias Período de 16/04/2011 a 14/08/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/10/2010
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
<hr/>	
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011	
Impresso em: 11/08/11 10:31:21	
1 de 3	11/08/2011 10:31

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf>

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 5255810/2 - Maria Alice Vieira Willrich

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-1/2	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	75	A	N	Concluída
FBC5764-4/2	Protídeos em Bioquímica Clínica	03/10/2007	30/10/2007	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5723-4/2	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais e Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-oclusivos	09/06/2008	29/06/2008	75	5	88.9	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia", na Revista Clínica Química Acta, v. 398, n. 1-2, p. 15-20, 2008, Holanda (1)	31/07/2008	31/07/2008	-	4	0	-	-	-
MCM5860-1/1	Prática de Laboratório I (Radioimunoensaio) (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	25/08/2008	07/09/2008	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
MCM5846-2/3	Fundamentos Teóricos e Práticos da Biologia Molecular Aplicada à Endocrinologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/09/2008	28/09/2008	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou do 4th Biologie Prospective Conference, com apresentação do trabalho, intitulado: CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression are affected by atorvastatin in HepG2 cell line, publicado na Revista Clinical Chemistry Laboratory Medicine, v. 46, n. 8, p. A143, 2008, Santorini, Grécia (1)	21/09/2008	23/09/2008	-	1	0	-	-	-
MCP5845-1/5	Tópicos Avançados Moleculares das Disfunções Cardiovasculares (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	30/03/2009	19/04/2009	45	3	100	A	N	Concluída
MIP5730-1/3	Biologia Molecular Aplicada ao Banco de Sangue (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/05/2009	01/06/2009	60	4	87.5	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	23
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 04/09/2009.

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.js>**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Impresso em: 11/08/11 10:31:21

Anexo 02. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

Planos de Saúde - Servidor

Página 1 de 2

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

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 119577	
Projeto de Pesquisa Estudo farmacogenômico da atorvastatina: Efeitos sobre expressão gênica e atividade funcional de CYP3A4 e CYP3A5 in vitro					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.03 - Farmácia - Nenhum			Grupo Grupo II	Nível Não se aplica	
Área(s) Temática(s) Especial(s) Genética Humana,			Fase Não se Aplica		
Unitérios CYP3A, hipercolesterolemia, atorvastatina					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 30	Total Brasil 30	Nº de Sujeitos Total 30	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NAO	Wash-out SIM	Sem Tratamento Específico NAO	Banco de Materiais Biológicos SIM	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Rosario Dominguez Crespo Hirata		CPF 005.886.998-02	Identidade 6409139-9		
Área de Especialização FARMACIA - ANALISES CLINICAS		Maiores Titulação Livres docente	Nacionalidade brasileira		
Endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17		Bairro Butantã	Cidade São Paulo - SP		
Código Postal 05508-900	Telefone (11) 3091-3660 /	Fax (11) 3813-2197	Email ROSARIOHIRATA@USP.BR		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. <i>Rosario D. C. Hirata</i> Data: 19/12/2006 Assinatura					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Hospital Universitário - Universidade de São Paulo		CNPJ 63.025.530/0085-12	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Orgão Divisão de Clínica Médica		Participação Estrangeira NAO	Projeto Multicêntrico NAO		
Endereço Av. Professor Lineu Prestes, 2565		Bairro Butantã	Cidade São Paulo - SP		
Código Postal 05508900	Telefone (11) 3812-7711	Fax (11) 3812-8004	Email cep@hu.usp.br		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: <i>Dr. Marcia Martins Silveira Bernik</i> Data: 20/12/2006 Assinatura					
Vinculada					
Nome Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo		CNPJ 63.025.530/0015-00	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Orgão Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas		Participação Estrangeira NAO	Projeto Multicêntrico NAO		
Endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - B13A		Bairro Cidade Universitária	Cidade São Paulo - SP		

http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/folha_rosto.cfm?vcod=119577

19/12/2006

Planos de Saúde - Servidor

Página 2 de 2

Código Postal 05508900	Telefone (11) 3091-3677	Fax (11) 3031-8986	Email cepfcf@usp.br
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: <u>Profa. Dra. Terezinha J. Andreoli Pinto</u> Data: <u>15 / 01 / 2007</u> <u>9007</u> Diretora FCF/USP Assinatura			

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 19/12/2006. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

[Voltar](#)[IMPRIMIR](#)http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/folha_rosto.cfm?vcod=119577

19/12/2006

Andamento do projeto - CAAE - 0066.0.198.018-06				
Título do Projeto de Pesquisa				
Estudo farmacogenômico da atorvastatina: Efeitos sobre expressão gênica e atividade funcional de CYP3A4 e CYP3A5 in vitro				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	20/12/2006 14:48:40	16/02/2007 13:02:37		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	19/12/2006 13:21:58	Folha de Rosto	FR119577	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	20/12/2006 14:48:40	Folha de Rosto	0066.0.198.018-06	CEPV
3 - Protocolo Aprovado no CEP	16/02/2007 13:02:37	Folha de Rosto	718/06	CEP

[Voltar](#)

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0066.0.198.018-06	
Projeto de Pesquisa			
Estudo farmacogenômico da atorvastatina: Efeitos sobre expressão gênica e atividade funcional de CYP3A4 e CYP3A5 in vitro			
Área(s) Temática(s) Especial(s)		Grupo	Fase
Genética Humana			Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF	Pesquisador Responsável	Assinatura	
00588699802	Rosario Dominguez Crespo Hirata		
Comitê de Ética			
Data de Entrega	Recebimento:	Assinatura	
20/12/2006		Maria José da Silva Téc. Acadêmico Cód. 2453211	

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

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 Domínguez 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

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

PARECER Nº 766/2005

Registro CONEP: 11288 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 283

Processo nº 25000.188434/2004-95

Projeto de Pesquisa: "Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos tratados com hipocolesterolemiantes".

Pesquisador Responsável: Dr. Rosário Domínguez Crespo Hirata.

Instituição: Deptº. de Análises Clínicas e Toxicologias, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Área Temática Especial: Genética humana.

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 293/2005, cabem as seguintes considerações:

- Foi apresentado racional para o cálculo da amostra e a faixa etária dos sujeitos da pesquisa.
- Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentada para atender a esclarecimentos sobre os procedimentos.
- Não haverá suspensão terapêutica para indivíduos em tratamento, pois serão incluídos apenas indivíduos que não estiverem utilizando medicação ou forem virgens de tratamento, e que possam permanecer sob orientação dietética no período determinado (1 mês).
- Foi apresentada garantia de atendimento e tratamento para os indivíduos que vierem a sofrer reações adversas aos medicamento.
- As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

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

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 22 de abril de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS