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

Efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em indivíduos hipercolesterolêmicos

Simone Sorkin Arazi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Assoc. Rosario Dominguez
Crespo Hirata

São Paulo
2008

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

Efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em indivíduos hipercolesterolêmicos

Simone Sorkin Arazi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Assoc. Rosario Dominguez
Crespo Hirata

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica

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

Arazi, Simone Sorkin

A663e Efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes HMGCR, LDLR, SREBF1a, SREBF2, SCAP e NPC1L1 em indivíduos hipercolesterolêmicos / Simone Sorkin Arazi. -- São Paulo, 2008. 154p.

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

Orientador: Hirata, Rosário Dominguez Crespo

1. Diagnóstico molecular ; Medicina 2. Farmacogenética
3. Lipídio : Metabolismo I. T. II. Hirata, Rosário Dominguez Crespo, orientador

616.0756 CDD

Simone Sorkin Arazi

Efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em indivíduos hipercolesterolêmicos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2008.

*If we knew what we were doing, it wouldn't be called
research (A. Einstein)*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

A D's

*Aos meus pais, **Lylia** e **Eduardo**, pelo amor incondicional e apoio nos momentos difíceis. Obrigada pela educação, formação e motivação que me deram para sempre seguir em frente e nunca desistir dos meus objetivos. Amo muito vocês!*

*Ao meu esposo, **Jack**, pela paciência, atenção e pelo enorme amor durante todos estes anos. Te amo muito!*

AGRADECIMENTOS

À Professora Rosario D.C. Hirata, minha orientadora, obrigada por todos estes anos de ensinamento, paciência e dedicação. Graças a você me tornei uma pessoa mais crítica e mais responsável. Muito obrigada!

Ao Professor Mario H. Hirata pelo apoio durante a vida acadêmica e pelos sábios conselhos nos diversos momentos em que precisei.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa e reserva técnica concedida (Proc. 04/11909-0) no período de dezembro de 2004 a setembro de 2008, que fizeram possível a realização deste trabalho e a participação em importantes reuniões científicas.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Chefe, Profa. Tit. Ana Campa, pela oportunidade de concluir esta importante etapa da minha carreira acadêmica.

À Profa. Primavera Borelli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Ao Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, em nome da Dra. Edna R. Nakandakare e Dra. Monica de Queiroz T.S. Neves pela seleção de pacientes e pelas importantes colocações na elaboração deste trabalho.

À Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em nome do Dr. Egidio Lima Dorea e Dra. Marcia M.S. Bernik pela seleção de pacientes e dedicação durante todo o tempo de colaboração.

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

Ao Laboratório Alvaro, em nome de seu diretor, Dr. Alvaro Largura, pelas análises bioquímicas de pacientes utilizados neste trabalho.

Ao estatístico Fidel Beraldi, pela colaboração na análise dos dados.

Aos pacientes das diferentes instituições envolvidas neste estudo, que colaboraram de maneira anônima e que sem eles o trabalho não teria sido construído, meus sinceros agradecimentos e sincera admiração!

À técnica do laboratório Cristina Moreno Fajardo, pelo apoio, ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

Aos estagiários Nadia de Preto Godoy, Ângela Yoshie e Leonardo Aneas Barreto pela imensa ajuda e colaboração no projeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnostico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP.

A minha querida e amada irmã, Dafna Sorkin Cohen, que mesmo longe sempre soube estar por perto e mostrar o seu apoio e amizade.

Ao querido Bernardo Bacicurinski que soube compreender os anseios nos momentos difíceis e esteve sempre ao meu lado; e a todos os familiares que estiveram por perto incentivando e admirando minha jornada.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse à conclusão desta etapa.

ARAZI, S.S. Efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em indivíduos hipercolesterolêmicos. 2008. 154f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RESUMO

A homeostase do colesterol é mediada por proteínas envolvidas na absorção (*NPC1L1*), regulação (*SREBP1*, *SREBP2*, *SCAP*), síntese (*HMGCR*) e remoção plasmática (*LDLR*). Os fármacos inibidores da síntese (vastatinas) e absorção (ezetimiba) do colesterol são potentes agentes hipocolesterolemiantes. Alterações em vários genes têm sido associadas a diferenças na resposta a diversos agentes terapêuticos. Com a finalidade de estudar os efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1*, foram selecionados 25 indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), 72 com hipercolesterolemia não familiar (HNF) e 125 indivíduos normolipidêmicos e sem doença cardiovascular (NL). Os indivíduos HF foram tratados com sinvastatina (40 mg/dia/4 sem) combinada ou não com ezetimiba (10 mg/dia/4sem) e os HNF foram tratados com atorvastatina (10 mg/dia/4sem). Amostras de sangue foram obtidas antes e após o tratamento para a extração de DNA e RNA e análise do perfil lipídico sérico. A expressão de mRNA dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi determinada por RT-PCR em tempo real empregando-se o gene da *GAPD* como controle endógeno. Os polimorfismos *SREBF1a* -36delG, *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G foram determinados por PCR-RFLP. Os indivíduos HF apresentaram maior expressão de mRNA dos genes *NPC1L1*, *HMGCR* e *LDLR* que os grupos HNF e NL ($p < 0,05$). O efeito da atorvastatina sobre a expressão dos genes estudados parece depender da expressão basal nos indivíduos HNF. A variação da expressão após o tratamento com atorvastatina nos pacientes do grupo HNF esteve correlacionada nos genes: *SREBF1a* e *SREBF2*; *SREBF1a* e *SCAP*; *SREBF1a* e *LDLR*; *SREBF2* e *SCAP*; *SREBF2* e *LDLR*; *HMGCR* e *LDLR*. O tratamento com sinvastatina e ezetimiba não modificou o padrão de expressão dos genes estudados no grupo HF. Os polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G parecem estar relacionados com diminuição da expressão de mRNA após o tratamento com atorvastatina. Foi observado que os portadores do genótipo GG do polimorfismo *SREBF2* G1784C apresentaram maiores concentrações séricas de colesterol total e LDL-C após o tratamento com atorvastatina. O polimorfismo *SCAP* A2386G parece estar associado com maiores concentrações de apoB em pacientes do grupo HNF antes do tratamento com atorvastatina. Os resultados são sugestivos que os genes *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* são regulados diferentemente de acordo com o estado metabólico do indivíduo e a taxa de expressão de mRNA é influenciada pelos polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G após o tratamento com atorvastatina.

Palavras chave: SREBPs. Hipercolesterolemia. Vastatinas. Ezetimiba. Farmacogenética. Expressão gênica.

ARAZI, S.S. Lipid lowering and polymorphisms effects on the expression of HMGCR, LDLR, SREBF1a, SREBF2, SCAP and NPC1L1 genes in hypercholesterolemic subjects. 2008. 154p. Thesis (Ph.D. Degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ABSTRACT

The regulation of cholesterol is mediated by proteins involved in the absorption (NPC1L1), regulation (SREBP1, SREBP2, SCAP), synthesis (HMGCR) and removal of plasma cholesterol (LDLR). Potent hypocholesterolemic agents inhibit cholesterol synthesis (statins) and its absorption (ezetimibe). Changes in several genes have been associated to different responses to various therapeutic agents. In order to evaluate the association between genes involved in the metabolism of cholesterol and their response to lipid lowering drugs, patients with familial (FH, n = 25) and non familial hypercholesterolemia (HNF, n = 72) were selected. Additionally, 125 normolipidemic individuals and without cardiovascular disease were selected (NL). The HF group were treated with simvastatin (40 mg/day/4 weeks) combined or not with ezetimibe (10 mg/day/4weeks). The HNF group were treated with atorvastatin (10 mg/day/4weeks). Blood samples were obtained prior to and following treatment for extraction of DNA and RNA, and serum lipid profile analysis. The mRNA expression of *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR*, *LDLR*, and *NPC1L1* genes was determined by real time RT-PCR using the *GAPD* gene as endogenous control. The polymorphisms *SREBF1a*-36delG, *SREBF2* G1784C, and *SCAP* A2386G were determined by PCR-RFLP. Individuals with HF showed higher expression of mRNA of genes *NPC1L1*, *HMGCR* and *LDLR* when compared with HNF and NL groups (p <0.05). The effect of atorvastatin on the gene expression seems to depend on the baseline expression in HNF subjects. The change of expression after treatment with atorvastatin in group HNF was correlated as followed: *SREBF1a* and *SREBF2*; *SREBF1a* and *SCAP*; *SREBF1a* and *LDLR*; *SREBF2* and *SCAP*; *SREBF2* and *LDLR*; *HMGCR* and *LDLR*. Treatment with simvastatin and ezetimibe did not change the gene-expression profile in HF group. The polymorphisms *SREBF2* G1784C, and *SCAP* A2386G appear to be related to a decreased expression of mRNA after treatment with atorvastatin. HNF group Carriers of GG genotype of *SREBF2* G1784C polymorphism had higher serum concentrations of total cholesterol and LDL-C after therapy. The *SCAP* A2386G polymorphism seems to be associated with higher concentrations of apoB in patients from HNF group prior to treatment with atorvastatin. The results suggest that the *HMGCR*, *LDLR* and *NPC1L1* genes are regulated according to the metabolic status of the individual, and the expression rate of mRNA is influenced by *SREBF2* G1784C and *SCAP* A2386G polymorphisms after atorvastatin therapy.

Keywords: SREBPs. Hypercholesterolaemia. Statins. Ezetimibe. Pharmacogenetics. Gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB1	ATP-binding cassette B1
ACAT	Acil-coenzima-A:colesterol aciltransferase
AIP	índice aterogênico do plasma
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
AST	Aspartato Aminotransferase
Apo	Apolipoproteína
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC	Apolipoproteína C
Apo E	Apolipoproteína E
bHLH-Zip	zíper de leucina hélice-alça-hélice básico
Bp	Pares de Bases
CETP	Proteína de Transferência de Colesterol Esterificado
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CK	Creatina quinase
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ER2	Receptor 2 da apo E
GAPD	gliceraldeído desidrogenase
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	Colesterol da HDL
HF	Hipercolesterolemia familiar
HNF	Hipercolesterolemia não familiar
HNF4 α	Fator nuclear hepático 4 α
HMG-CoA	3-hidróxi-3metil-glutaril Coenzima A
HMGCR	HMG-CoA redutase
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
INSIG	Insulin induced gene
IMC	Índice de Massa Corpórea
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	Colesterol da LDL
LDLR	Receptor da LDL
LRP	Proteína relacionada ao receptor da LDL
LPL	Lipoproteína lipase
LXR	Liver-X-Receptor
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NL	Normolipidêmicos

NPC 1	Niemman Pick C1
NPC 2	Niemman Pick C2
NPC1L1	Niemman Pick C1 Like 1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
RE	Retículo endoplasmático
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
RXR	Retinoid X receptor
mRNA	RNA Mensageiro
SNP	Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo
SR-B1	Receptor Scavenger do tipo 1
SRE	Elementos reguladores de colesterol
SREBP1a	Sterol regulatory element-binding protein 1a
SREBP2	Sterol regulatory element-binding protein 2
SREBF1a	Sterol regulatory element-binding factor 1 – gene da SREBP 1a
SREBF2	Sterol regulatory element-binding factor 2 – gene da SREBP 2
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TSH	Hormônio tireostimulante
UNG	Uracil – N - glicosilase
UTR	região não codificadora
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-c	Colesterol da VLDL
VLDLR	Receptor da VLDL

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INICIADORES UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE PCR-RFLP	44
TABELA 2 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PELA PCR PARA OS POLIMORFISMOS <i>SREBF1A</i> -36DELG, <i>SREBF2</i> G1784C E <i>SCAP</i> A2386G.....	45
TABELA 3 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA OS ENSAIOS DE RESTRIÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR COM ENDONUCLEASES.	45
TABELA 4 - DADOS DE QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA OBTIDAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO NOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS	51
TABELA 5 - NÚMERO DE CATÁLOGO DOS ENSAIOS UTILIZADOS (INICIADORES + SONDA).....	53
TABELA 6 - VALORES DE INCLINAÇÃO DA CURVA E EFICIÊNCIA DOS ENSAIOS DE RT-PCR EM TEMPO REAL.	55
TABELA 7 - MUTAÇÕES NO GENE <i>LDLR</i> DETECTADAS EM INDIVÍDUOS COM HF	59
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS E VALORES DE LIPÍDEOS SÉRICOS BASAIS DOS INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL (HF), HIPERCOLESTEROLEMIA NÃO-FAMILIAL (HNF) E NORMOLIPIDEMIA (NL)	61
TABELA 9 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS LIPÍDEOS DO PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS DO GRUPO HNF, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA.	62
TABELA 10 - VALORES DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS LIPÍDEOS DO PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS DO GRUPO HF, ANTES (BASAL) E APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA ISOLADA (SINVA) E EM ASSOCIAÇÃO COM EZETIMIBA (SINVA+EZE).	64
TABELA 11 - EXPRESSÃO BASAL DE MRNA DOS GENES ESTUDADOS EM CMSP DE INDIVÍDUOS DOS GRUPOS HF, HNF E NL	66
TABELA 12 - VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA DOS GENES ESTUDADOS EM CMSP DE INDIVÍDUOS HNF TRATADOS COM ATORVASTATINA	67
TABELA 13 - VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA DOS GENES ESTUDADOS EM CMSP DE INDIVÍDUOS HF TRATADOS COM SINVASTATINA COMBINADA OU NÃO COM EZETIMIBA.....	68
TABELA 14 - RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SREBF1A</i> EM CMSP E A RESPOSTA A ATORVASTATINA EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	75
TABELA 15 - RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SREBF2</i> EM CMSP E A RESPOSTA A ATORVASTATINA EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	76
TABELA 16 - RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SCAP</i> EM CMSP E A RESPOSTA A ATORVASTATINA EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	77
TABELA 17 - RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>HMGCR</i> EM CMSP E A RESPOSTA A ATORVASTATINA EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	78
TABELA 18 - RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>LDLR</i> EM CMSP E A RESPOSTA A ATORVASTATINA EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	79
TABELA 19 - DISTRIBUIÇÃO DE GENÓTIPOS E FREQUÊNCIA RELATIVA DE ALELOS PARA OS POLIMORFISMOS -36DELG DO <i>SREBF1A</i> , G1784C DO <i>SREBF2</i> E A2386G DO <i>SCAP</i> NOS GRUPOS HIPERCOLESTEROLEMIA NÃO-FAMILIAL (HNF), E NORMOLIPIDÊMICOS (NL).....	80
TABELA 20 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS EM INDIVÍDUOS NL PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SREBF1A</i> - 36DELG.	84

TABELA 21 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS EM INDIVÍDUOS NL PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SREBF2</i> G1784C.....	85
TABELA 22 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS EM INDIVÍDUOS NL PORTADORES DE DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SCAP A2386G</i>	85
TABELA 23 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS NO PERÍODO BASAL E APÓS TRATAMENTO COM ATORVASTATINA, EM PACIENTES HNF, COM DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SREBF1A</i> -36DELG.....	87
TABELA 24 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS NO PERÍODO BASAL E APÓS TRATAMENTO COM ATORVASTATINA, EM PACIENTES HNF, COM DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SREBF2</i> G1784C.....	88
TABELA 25 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS NO PERÍODO BASAL E APÓS TRATAMENTO COM ATORVASTATINA, EM PACIENTES HNF, COM DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>SCAP A2386G</i>	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - METABOLISMO ENDÓGENO E EXÓGENO DO COLESTEROL.....	19
FIGURA 2 - CASCATA DE SÍNTESE DO COLESTEROL A PARTIR DA ACETIL CoA.....	22
FIGURA 3 - REGULAÇÃO INTRACELULAR DA EXPRESSÃO DO GENE <i>LDLR</i>	25
FIGURA 4 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2%, CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO, DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DO SNP <i>SREBF1A</i> -36DELG	46
FIGURA 5 - ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA 10% DOS PERFIS DE RFLP DO POLIMORFISMO <i>SREBF2</i> G1784C.....	47
FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10%, CORADO COM NITRATO DE PRATA, DOS PERFIS DE RFLP DO SNP <i>SCAP</i> A2386G.....	48
FIGURA 7 - MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO EXON 5 DO GENE <i>LDLR</i>	59
FIGURA 8 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS LÍPIDES DE PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS DO GRUPO HNF ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA..	62
FIGURA 9 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS LÍPIDES DE PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS DO GRUPO HF ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA (SINVA) E SINVASTATINA COM EZETIMIBA (SINVA + EZE)..	65
FIGURA 10 - EXPRESSÃO BASAL DE MRNA DOS GENES <i>SREBF1A</i> , <i>SREBF2</i> , <i>SCAP</i> , <i>HMGCR</i> , <i>LDLR</i> E <i>NPC1L1</i> EM CMSP DE INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL (HF), NÃO-FAMILIAL (HNF) E NORMOLIPIDÊMICOS (NL).....	66
FIGURA 11 - BOX PLOTS DE VALORES DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DOS GENES <i>SREBF1A</i> , <i>SREBF2</i> , <i>SCAP</i> , <i>HMGCR</i> E <i>LDLR</i> EM CMSP DO GRUPO HNF, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA.	67
FIGURA 12 - BOX PLOTS DE VALORES DE EXPRESSÃO NORMALIZADA DOS GENES <i>SREBF1A</i> , <i>SREBF2</i> , <i>SCAP</i> , <i>HMGCR</i> , <i>LDLR</i> E <i>NPC1L1</i> EM CMSP DO GRUPO HF, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA E SINVASTATINA COMBINADA COM EZETIMIBA..	68
FIGURA 13 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIAÇÕES DA EXPRESSÃO DE MRNA ($\Delta C_{T\text{ATORVA}} - \Delta C_{T\text{BASAL}}$) EM CMSP APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA. <i>R</i>	70
FIGURA 14 - VALORES DE EXPRESSÃO DE MRNA DE <i>SREBF1A</i> , <i>SREBF2</i> , <i>SCAP</i> , <i>LDLR</i> E <i>HMGCR</i> EM CMSP ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA..	72
FIGURA 15 - PERFIL LIPÍDICO SÉRICO EM RESPOSTA A ATORVASTATINA DE ACORDO COM O PADRÃO DE EXPRESSÃO NOS GENES <i>SREBF1A</i> , <i>SREBF2</i> , <i>SCAP</i> , <i>HMGCR</i> E <i>LDLR</i> EM PACIENTES DO GRUPO HNF.	73
FIGURA 16 - RELAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>SREBF1A</i> -36DELG E A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SREBF1A</i> EM CMSP EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS (A) E HIPERCOLESTEROLÊMICOS NÃO-FAMILIAL (B), ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA	81
FIGURA 17 - RELAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>SREBF2</i> G1784C E A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SREBF2</i> EM CMSP EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS (A) E HIPERCOLESTEROLÊMICOS NÃO-FAMILIAL (B), ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA.	82
FIGURA 18 - RELAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>SCAP</i> A2386G E A EXPRESSÃO DE MRNA DO <i>SCAP</i> EM CMSP EM INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS (A) E HIPERCOLESTEROLÊMICOS NÃO-FAMILIAL (B), ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA.	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL	17
1.1.1 Absorção	17
1.1.2 Transporte de lipoproteínas	19
1.1.3 Síntese intracelular	21
1.1.4 Transporte reverso do colesterol.....	23
1.2. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE DO COLESTEROL	23
1.3. HIPERCOLESTEROLEMIA E TRATAMENTO	27
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. OBJETIVO GERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 CASUÍSTICA E PROTOCOLO TERAPÊUTICO	39
3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	40
3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	41
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	43
3.5 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	43
3.6 TRIAGEM DE MUTAÇÕES DOS GENES <i>LDLR</i> E <i>APOB</i>	48
3.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA	49
3.8 EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO RNA TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES	50
3.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MRNA POR RT-PCR EM TEMPO REAL	52
3.10 CONTROLE DE QUALIDADE DAS REAÇÕES DE PCR-RFLP E RT-PCR	56
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	56
4. RESULTADOS.....	58
4.1 ANÁLISE MOLECULAR DOS INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL	58
4.2 EFEITOS DE HIPOLIPEMIANTE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO	60
4.3 EFEITOS DE HIPOLIPEMIANTE SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM CMSP	65
4.4 RELAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A EXPRESSÃO GÊNICA EM CMSP ..	80
4.5 RELAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM O PERFIL LIPÍDICO	84
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÕES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
APÊNDICES	114
ANEXOS	123

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo do colesterol

1.1.1 Absorção

O colesterol no organismo é oriundo da dieta e é produzido nas células, principalmente nos hepatócitos. O colesterol da dieta é absorvido pelas células intestinais sendo incorporado aos quilomícrons que realizam seu transporte na circulação linfática e sanguínea (TULENKO; SUMMER, 2002) (Figura 1)

A absorção do colesterol das micelas no lúmen é mediada por um transportador, Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) (ALTMANN *et al* 2004). O NPC1L1 faz parte da família de proteínas do tipo NPC juntamente com as NPC1 e NPC2. A proteína NPC1 facilita a liberação do colesterol captado da LDL endossomo ao retículo endoplasmático. A proteína NPC2 está localizada nos lisossomos e é requerida para a reesterificação do colesterol intracelular, mas seu mecanismo de ação exato ainda não é completamente conhecido (ORY, 2004).

O gene *NPC1L1* está localizado no cromossomo 7p13, contém 20 exons, possui aproximadamente 29 kb e sua região promotora contém elementos reguladores de colesterol (SREs), sítio de ação de fatores de transcrição de membrana denominados proteínas ligantes de elemento regulatório de esterol (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*, SREBPs) (DAVIES; LEVY; IOANNOU, 2000)

Alguns estudos sugerem que o colesterol regule a expressão do *NPC1L1* através da ativação da SREBP do tipo 2 (SREBP-2). A transcrição de mRNA hepático e intestinal de *NPC1L1* é positivamente regulada em animais privados de colesterol (TELFORD *et al.*, 2007, ALREFAI *et al.* 2007). Liu *et al.* (2005) demonstraram que a transcrição de mRNA intestinal é negativamente regulada em ratos alimentados com colesterol ou deficientes de acil-coenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT2) que acumulam colesterol livre nos enterócitos.

Vários receptores nucleares também podem regular a transcrição do *NPC1L1*, como os *Peroxisome proliferator-activated receptor* α e γ (PPAR γ e PPAR α) (VAN DER VEEN *et al.* 2005, DUVAL *et al.*, 2006; MATHUR; WATT; FIELD, 2007; VALASEK; CLARKE; REPA, 2007), Liver-X-Receptor (LXR) (KRUIT *et al.* 2005) e *Retinoid X receptor* (RXR) (LALLOYER *et al.*, 2006). Adicionalmente, a expressão do *NPC1L1* também pode ser modulada pela concentração plasmática de estrógeno (DUAN *et al.*, 2006) e pela presença de diabetes (LALLY *et al.*, 2006).

O colesterol é uma substância lipofílica e, portanto, deve ser solubilizado para ser absorvido. As micelas de ácidos biliares agem como carreadores e solubilizadores de colesterol, passando pela resistência do meio aquoso na borda dos enterócitos e facilitando a absorção (ROS, 2000).

Na figura 1 está esquematizado o metabolismo endógeno e exógeno do colesterol. A participação da *NPC1L1* na absorção de colesterol da dieta é indicada.

Figura 1 - Metabolismo endógeno e exógeno do colesterol (LUSIS *et al.*, 2004).

1.1.2 Transporte de lipoproteínas

Os quilomícrons são lipoproteínas ricas em triglicérides sintetizadas nas células da mucosa intestinal baseado em lípidos da dieta (triglicérides, colesterol e fosfolípidos) e apolipoproteína (apo) B-48. Os quilomícrons recém sintetizados são secretados nos vasos linfáticos e atingem a circulação sanguínea através do ducto torácico. Na circulação, os quilomícrons adquirem apo C e apo E, e sofrem a ação da lipoproteína lipase (LPL), enzima que catalisa a hidrólise de triglicérides liberando ácidos graxos livres para os tecidos através da ação da proteína CD36.

Nesse processo, os quilomícrons são transformados em partículas ricas em colesterol, os remanescentes de quilomícrons, que são captados pelos hepatócitos por ligação a receptores de VLDL (VLDLR), por receptores de LDL (LDLR), e à proteína relacionada ao LDLR (LRP) que reconhecem e se ligam a apo E (YU; CHEN; COOPER, 2001). Nos hepatócitos, o colesterol oriundo dos quilomícrons remanescentes é destinado à produção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) ou à formação de sais biliares que é a forma de eliminação do colesterol pela via biliar (TULENKO; SUMMER, 2002).

O colesterol dos hepatócitos é incorporado nas partículas de VLDL, lipoproteínas ricas em triglicérides que contêm a apo B-100, apo C e apo E. Na circulação plasmática, as VLDL também sofrem ação da LPL e são convertidas em partículas ricas em colesterol, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As IDL sofrem hidrólise adicional de triglicérides pela ação da lipase hepática e são convertidas em LDL. As LDL são removidas do plasma por interação com os LDLR, presentes nos hepatócitos e em outros tipos celulares (BROWN; GOLDSTEIN 1986). A via de captação e degradação das LDL foi descrita por Brown e Goldstein (1986). Os LDLR fazem parte do mecanismo de remoção das LDL do plasma e fornecimento do colesterol para as células; por isso são responsáveis pela manutenção da homeostase do colesterol no plasma e nos tecidos e, ao mesmo tempo, protegem as células do acúmulo do colesterol. Quando a quantidade de colesterol na célula é baixa, novos LDLR são sintetizados e migram para a membrana celular. Os LDLR ligam a apo B-100 presente nas LDL e se agrupam em *coated pits* que se invaginam e se desprendem para formar endossomos dentro do citoplasma. O colesterol esterificado é hidrolisado e o colesterol livre é utilizado na formação das

membranas celulares ou é armazenado nas células na forma de éster de colesterol. É também empregado na produção de hormônios esteróides nos tecidos esteroideogênicos.

O LDLR faz parte de uma família de receptores ancorados à membrana celular, que incluem o receptor da VLDL (VLDLR), a proteína relacionada ao receptor da LDL (LRP), a megalina, o receptor 2 da apo E (ER2), entre outros (HUSSAIN; STRICKLAND; BAKILLAH, 1999, CHUNG; WASAN, 2004). O papel do LDLR, no metabolismo e na regulação intra e extracelular do colesterol, foi demonstrado nos estudos com pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF), doença hereditária autossômica dominante, caracterizada por mutações no gene *LDLR* (BROWN; GOLDSTEIN 1986).

O gene do *LDLR* está localizado na parte distal do braço curto do cromossomo 19 e possui 18 exons e 17 introns. O RNA mensageiro (mRNA) tem tamanho de 5,3 kb e codifica uma proteína de 860 aminoácidos. O exon 1 codifica os 21 aminoácidos do peptídeo de sinalização da proteína, que é clivado durante a translocação da proteína para o retículo endoplasmático. (VARRET *et al.*, 2008)

1.1.3 Síntese intracelular

O colesterol é sintetizado em muitas células, principalmente nos hepatócitos e nos enterócitos, começando pelo acetato. Há várias etapas envolvidas nesse processo de síntese e o passo limitante é a conversão da 3-

hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (HMGCR) (GOLDSTEIN; BROWN, 1990).

Na figura 2, está ilustrada a rota de síntese de colesterol a partir da Acetil CoA. O gene da *HMGCR* está localizado no cromossomo 3, e possui 20 exons. Sua região promotora contém um domínio sensível aos esteróis (SRE) similar ao encontrado em outros genes também responsivos aos esteróis como o gene *LDLR* e o gene *NPC1L1*.

Figura 2 Cascata de síntese do colesterol a partir da Acetil CoA.

1.1.4 Transporte reverso do colesterol

O colesterol celular é removido das membranas citoplasmáticas e transportado ao fígado para posterior eliminação por um mecanismo complexo denominado transporte reverso do colesterol que é mediado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (RADER, 2002).

As HDL nascentes são constituídas de apo AI e fosfolípidos e são secretadas pelas células da mucosa intestinal e do fígado. As HDL captam o colesterol das células periféricas, que é esterificado pela lecitina colesterol acil transferase (LCAT), enzima ativada por apo AI das HDL. Estas lipoproteínas são removidas da circulação por ligação com o receptor *scavenger* classe B do tipo 1 (SR-B1) dos hepatócitos (TRIGATTI; RIGOTTI; KRIEGER, 2000, FREDENRICH; BAYER, 2003). Este receptor se liga a HDL com alta afinidade, é expresso primariamente pelo fígado e pelos tecidos estrogênicos e possui diferentes sítios de ligação no seu domínio extracelular. O SR-B1 modula a troca bidirecional de lipídeos na membrana plasmática participando de captação e efluxo seletivo do colesterol (ADACHI; TSUJIMOTO, 2006, RHAINDS; BRISSETTE, 2004).

1.2. Regulação da homeostase do colesterol

A expressão dos genes *NPC1L1*, *LDLR* e *HMGR* é regulada pelos SREBPs. Estes fatores de transcrição ativam diretamente a expressão de mais de 30 genes envolvidos na síntese e captação de colesterol, triglicérides e fosfolípidos, assim como o cofator NADPH necessário para a síntese destas moléculas. No fígado, as SREBPs regulam a produção de triglicérides e colesterol que são secretados para o plasma sob a forma de lipoproteínas e

também excretados na bile em forma de micelas (HORTON; GOLSTEIN; BROWN, 2002).

Os SREBPs pertencem à família de fatores de transcrição que contem zíper de leucina hélice-alça-hélice básico (bHLH-Zip) e são sintetizados como precursores inativos ligados ao retículo endoplasmático (RE). Cada SREBP precursor contém a região bHLH-Zip para a ligação do DNA e um domínio carboxi-terminal que é responsável pela resposta às variações na concentração de colesterol (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). Para alcançar o núcleo e exercer sua atividade reguladora, o domínio amino-terminal do SREBP é liberado da membrana por processo proteolítico, mediado por três proteínas: a SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP) e as proteases *site-1 protease* (S1P) e *site-2 protease* (S2P) (HORTON; SHIMOMURA, 1999). Na figura 3, é apresentado um esquema que mostra os elementos que participam da regulação intracelular de colesterol.

O colesterol aumentado na célula se liga a SCAP, mudando sua estrutura conformacional, causando a ligação dessa proteína a proteína INSIG (insulin induced gene). Isso impede a ligação do complexo Sar1/sec23/24 a SCAP e conseqüentemente a SCAP permanece no RE, impedindo assim a ação transcricional do SREBP (GOLDSTEIN; DEBOSE-BOYD; BROWN, 2006) (Figura 3).

Os SREBPS são classificados em SREBP1a, SREBP1c e SREBP2. Os SREBP1a e SREBP1c são codificadas por um único gene, *SREBF1*, localizado no cromossomo 17p11.2, que tem regiões promotoras alternativas para transcrição de cada proteína. Esses fatores são idênticos exceto pela região amino-terminal responsável pela ativação da transcrição de vários genes. O SREBP1a é um ativador potente de todos os genes responsivos ao SREBP (SHIMANO, 2001). O SREBP1c se liga nos promotores contidos nos E-box de genes lipogênicos requeridos para síntese de triglicérides e ácidos graxos. O SREBP2 é codificado pelo gene *SREBF2* localizado no cromossomo 22q13 (HUA *et al.*, 1995) e é ativo nos SREs presentes em regiões promotoras de genes colesterogênicos.

O gene *SCAP* está localizado no cromossomo 3, possui 23 exons e codifica uma proteína de 1276 aminoácidos. A porção aminoterminal da proteína contém oito seqüências hidrofóbicas separadas por pequenas alças hidrofílicas. Esse domínio está também presente na HMGCoA redutase e compreende uma área de sensor de colesterol, enquanto a porção carboxi-terminal contém a função biológica restante. (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2004)

1.3. Hipercolesterolemia e tratamento

A doença arterial coronariana (DAC) é uma importante doença cardiovascular que tem elevado índice de mortalidade no mundo. De acordo com estimativas da *World Heart Federation*, a doença cardiovascular é responsável, na população mundial, por 17 milhões de óbitos por ano (<http://www.worldheart.org>). No Brasil, segundo dados do DATASUS (<http://www.datasus.gov.br>), a mortalidade proporcional por doenças do aparelho circulatório foi de 31,54% no ano de 2003.

A hipercolesterolemia se caracteriza pela elevação das concentrações séricas de LDL-C e colesterol total. Vários fatores podem influenciar as concentrações séricas de colesterol nos indivíduos tais como a idade, o gênero masculino, hormônios, tabagismo, atividade física, dieta rica em gorduras saturadas e constituição genética.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é um distúrbio hereditário autossômico dominante, causado por mutações no gene que codifica o receptor da LDL (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Essas mutações alteram a estrutura e função do receptor da LDL, que normalmente remove a LDL do plasma, levando a um aumento das concentrações de colesterol sanguíneo, o que conseqüentemente leva, invariavelmente, ao desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) precoce.

O estudo de Framingham mostrou que os valores de colesterol total, LDL-C e HDL-C são indicadores de risco para a ocorrência futura de eventos clínicos da doença aterosclerótica (CASTELLI, 1984). Outro estudo, o Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT), envolvendo 360 mil indivíduos entre 35 e 57

anos, comprovou de modo claro e inequívoco a relação entre colesterolemia e frequência de mortalidade de DAC (STAMLER; WENTWORTH; NEATON, 1986). Outros estudos importantes são: o Estudo dos Sete Países (KEYS, 1970) e o Estudo da Organização Mundial da Saúde (SIMONS, 1986).

Além dos fatores ambientais, como o aumento do consumo de colesterol e gordura saturada, fumo, e outros (Resumo das IV Diretrizes Brasileiras, 2007), os fatores metabólicos que afetam as taxas de absorção, distribuição e excreção do colesterol podem influenciar de forma significativa a homeostase do colesterol plasmático (SEHAYEK *et al.*, 1998).

Mudanças no estilo de vida são recomendadas pelo National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines (NCEP ATP III) - (GRUNDY *et al.*, 2004) para reduzir a hipercolesterolemia e, conseqüentemente diminuir o risco de doenças cardiovasculares. Tais mudanças incluem: redução de ingestão de gordura saturada e de colesterol, redução de peso e prática de atividade física regular. Entretanto, essas condutas nem sempre são eficazes e há necessidade de intervenção farmacológica.

Os medicamentos hipocolesterolemiantes são classificados em: inibidores da HMGCR (vastatinas), seqüestradores de ácidos biliares (colestiramina, colestipol), ácido nicotínico e seus derivados e inibidores da absorção do colesterol (ezetimiba). Os medicamentos mais largamente utilizados são as vastatinas.

As vastatinas são inibidores da HMGCR, enzima-chave da síntese de colesterol (VAUGHAN; GOTTO, 2004). A ação das vastatinas resulta na diminuição da concentração do colesterol intracelular, que induz o aumento na

síntese de LDLR na membrana celular hepática. Essa alteração induz o aumento da captação de LDL e, conseqüentemente, a diminuição da concentração do colesterol plasmático (VAUGHAN; GOTTO, 2004).

Há diferentes tipos de vastatinas que diferem pela absorção, ligação com proteínas plasmáticas, excreção e solubilidade. A atorvastatina é administrada via oral como sal cálcico da forma ativa hidroxí-ácida (VAUGHAN; GOTTO, 2004). Já a sinvastatina é administrada na forma de lactona inativa (GARCIA *et al.*, 2003). Ambas vastatinas são biotransformadas primariamente pela enzima CYP3A4 do citocromo P450 e sofrem conjugação com ácido glicurônico mediado pelas enzimas UDP-glicuronil transferases UGT1A1 e UGT1A3 (JACOBSEN *et al.*, 2000; PRUEKSARITANONT *et al.*, 2002). A captação e o efluxo celular da atorvastatina são realizados pelos transportadores OATP1B1, glicoproteína P e outros (BOGMAN, 2001; CHEN *et al.*, 2005). Poucos trabalhos estudaram a captação e efluxo celular da sinvastatina. A sinvastatina inibe o transporte mediado pela OATP1B1, sugerindo que ela também pode ser um substrato da OATP1B1. Entretanto, a contribuição desse transportador para a captação da sinvastatina parece ser baixa porque essa vastatina lactônica é lipofílica e é captada pelos hepatócitos, e mesmo por outros tecidos, através de difusão passiva. (SHITARA; SUGIYAMA, 2006)

Vários estudos foram realizados comprovando a eficácia da sinvastatina. O principal deles é o Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) que estudou 4444 pacientes tratados com este medicamento e demonstrou reduções de 25% no colesterol total e 35% no LDL-C em comparação com o grupo placebo (PEDERSEN, 1998; EDWARDS; MOORE, 2003).

Alonso *et al* (2005) demonstraram que o tratamento isolado da sinvastatina em pacientes com HF reduziu efetivamente as concentrações séricas de LDL-C. A sinvastatina também reduziu os triglicérides séricos e aumentou o HDL-C sérico, além de reduzir a oxidação do LDL-C e a inflamação vascular, e melhorar a função endotelial.

O principal trabalho avaliando a eficácia da atorvastatina foi o Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA). Esse estudo multicêntrico avaliou 10.305 indivíduos tratados com a atorvastatina e tiveram como resultados a redução em 24% nas concentrações séricas de colesterol total após um ano de tratamento com atorvastatina 10mg/dia e redução em 35% nas concentrações de LDL-C no mesmo período (SEVER *et al.*, 2003).

Uma meta-análise recente demonstrou que a redução de LDL-C contribui com mais de 75% da variação na redução de risco da mortalidade por eventos cardiovasculares. A redução de 1 mmol/L (39 mg/dL) de LDL-C leva a redução de 15% na mortalidade em geral, 24% de mortalidade coronariana, 27% na incidência de infarto do miocárdio não fatal e 24% em acidente vascular cerebral (GENSER; MARZ 2006). Esse estudo conclui que à medida que as vastatinas reduzem as concentrações plasmáticas de LDL-C, há melhoras significantes nos desfechos clínicos de eventos cardiovasculares.

Rogers *et al.* (2007) publicaram uma meta-análise comparando as mudanças no perfil lipídico em estudos com a atorvastatina e sinvastatina. Seus principais resultados incluíram a maior potência da atorvastatina em comparação com sinvastatina, quando foram avaliadas as reduções nas concentrações

séricas de colesterol total, LDL-C e triglicérides. Os autores também observaram que, em altas doses, a sinvastatina tem maior efeito sobre o aumento HDL-C sérico que a atorvastatina.

A ezetimiba é um hipocolesterolemizante que bloqueia a absorção seletiva de colesterol nos enterócitos por inibição do transportador NPC1L1 presente na membrana plasmática. Esse bloqueio não afeta a absorção de triglicérides, ácidos graxos, ácidos biliares ou vitaminas lipossolúveis e os alfa- e beta-carotenos (JURADO; SEIP; THOMPSON, 2004).

A ezetimiba sofre rápida conjugação com ácido glicurônico nas células intestinais, é captado pelo sistema porta no fígado e excretado pela bile, resultando em baixas concentrações plasmáticas. Notavelmente, seu metabólito, o glicuronídeo de ezetimiba, é ainda mais potente como inibidor da absorção do colesterol do que o composto original (BRUCKERT; GIRAL; TELLIER, 2003). O longo tempo de meia vida, 22 horas, permite uma única dose diária, mas não afeta sua atividade e a alimentação não afeta sua biodisponibilidade. A ezetimiba não interage com medicamentos ou xenobióticos biotransformados por enzimas da família citocromo P450 (CYP) 1A2, 2D6, 2C8, 2C9 OU 3A4, principalmente as vastatinas, sugerindo que tem um baixo potencial de interação medicamentosa (DAVIDSON, 2003).

A ezetimiba pode ser utilizada em monoterapia, mas é mais freqüentemente administrado em associação com vastatinas como sinvastatina e outras (DAVIDSON *et al.*, 2002, BALLANTYNE *et al.*, 2003, MELANI *et al.*, 2003). A monoterapia com sinvastatina resultou em diminuição de concentrações séricas colesterol total (26,8%) e de LDL-C (37,5%), enquanto que a associação

com ezetimiba produziu redução mais significativa desses lipídeos séricos (colesterol total: 38 % e LDL-C: 52 %) (SAGER *et al.*, 2003).

Yamamoto *et al* (2006) verificou que o uso de ezetimiba é recomendável com uma vastatina para reduzir os níveis de LDL-C em pacientes com HF homozigótica submetidos à aférese de LDL. As taxas de redução de LDL-C e CT nesse estudo foram de 9,6% e 9,0% respectivamente. Estudos mostraram que a co-administração de ezetimiba com a sinvastatina de 10 ou 20 mg permitiu que mais pacientes em prevenção secundária pudessem atingir as concentrações séricas de LDL-C abaixo de 100 mg/dL. (FARNIER *et al* 2005, DAVIDSON *et al* 2002).

Uma meta análise comparou estudos publicados entre janeiro de 1993 e dezembro de 2005 e revelou que a média de redução de colesterol total por ezetimiba em associação com vastatinas foi de 17,3%, maior que a de vastatina isoladamente (14,8%, $p < 0,0001$); em relação à redução de LDL-C, a associação com ezetimiba reduziu em 25,6%, redução mais acentuada quando comparado com o tratamento de vastatinas em monoterapia (21,7%, $p < 0,0001$) (MIKHAILIDIS *et al.*, 2007).

Embora as vastatinas tenham alta eficácia terapêutica, foram observadas diferenças interindividuais significativas na resposta farmacológica. Vários fatores que interferem na farmacocinética das vastatinas podem alterar a duração ou magnitude da exposição a esses medicamentos e afetar a sua eficácia e toxicidade.

Em uma meta-análise recente, foram avaliados resultados de 23 estudos de tratamentos com vastatinas envolvendo mais de 300.000 indivíduos

(ALSHEIKH-ALI *et al.*2007). No estudo não foi encontrada relação entre a porcentagem de redução de LDL-C e o aumento de enzimas hepáticas ou rabdomiólise. Entretanto, com altas doses de vastatinas, a cada 10% de redução de LDL-C, as taxas de enzimas aumentaram, sugerindo que o risco de aumento de lesão hepática e ou rabdomiólise pelas vastatinas não está relacionado com a magnitude da redução do LDL-C.

As vastatinas passam por um extenso metabolismo via CYP450 e particularmente a sinvastatina e a atorvastatina são metabolizadas pela CYP3A4. (NEUVONEN; NIEMI; BACKMAN, 2006). Portanto, variantes genéticas associadas com a farmacocinética das vastatinas parecem ter um significativo impacto na resposta terapêutica a estes medicamentos.

Kajinami *et al.* (2004) avaliaram dois polimorfismos no gene da CYP3A4 e encontraram que a variante A-290G foi associada com maiores concentrações de LDL-C, após o tratamento com atorvastatina, enquanto que o polimorfismo M445T foi associado com menores concentrações de LDL-C, antes e após o tratamento com atorvastatina.

Variantes do gene da CYP3A5, enzima do citocromo P450 que juntamente com a CYP3A4 metaboliza a atorvastatina, também foram estudadas. Kivisto *et al.* (2004) encontraram maior redução nas concentrações séricas de colesterol total e LDL-C após o tratamento com lovastatina, sinvastatina e atorvastatina nos portadores do alelo CYP3A5*1 quando comparados aos portadores do alelo CYP3A5*3 . Em recente trabalho do nosso grupo foi observado que o alelo CYP3A5*3A (rs776746) foi associado com menor

redução de LDL-C e colesterol total em pacientes tratados com atorvastatina (WILLRICH *et al.*, 2008).

Os transportadores de membrana também estão envolvidos na biodisponibilidade das vastatinas. Fiegenbaum *et al.* (2005b) estudaram variantes no gene da glicoproteína P, denominado *ABCB1*, e encontraram que a variante *ABCB1* 1236T foi relacionada com maior redução no colesterol total e LDL-C após o tratamento com sinvastatina. Rodrigues *et al.* (2006) descreveram que a atorvastatina causa uma diminuição da função da *ABCB1* e modula sua síntese em células HepG2 e em células mononucleares do sangue periférico. A resposta de LDL-C sérica a fluvastatina também parece estar influenciada por variantes nos genes do *ABCB1* e da proteína de transferência do colesterol esterificado (CETP) em indivíduos portadores de HF (BERCOVICH *et al.*, 2006).

Variantes em genes que regulam o metabolismo do colesterol e que estão envolvidos na estrutura, secreção e catabolismo de lipoproteínas têm sido associados com variabilidade na resposta as vastatinas.

Em estudo prévio de nosso grupo, foi observado que o polimorfismo *Ins/del* do gene da apolipoproteína B (APOB) foi associado com menor resposta a fluvastatina (GUZMAN *et al.*, 2000). Também observamos que os alelos comuns das variantes G-75A (rs670) e C+83T (rs5069) do gene da apo AI (APOA1) foram associadas com menores concentrações séricas de triglicérides e VLDL-C, em mulheres, após o tratamento com atorvastatina (SORKIN *et al.*, 2005). Recentemente, descrevemos a relação de variantes do gene *ATP binding cassette* tipo A1 (*ABCA1*) (rs2230806) com o perfil menos aterogênico porém não com a resposta terapêutica a atorvastatina (GENVIGIR *et al.* 2008)

A relação de variantes do gene do LDLR e a resposta a fluvastatina foi observada em estudo anterior do nosso grupo (SALAZAR *et al.*, 2000). Os polimorfismos *LDLR* Avall (rs5925) e Pvull (rs2569542) foram associados com menores reduções nas concentrações séricas de colesterol total, LDL-C e apolipoproteína B após o tratamento. Esta associação não foi influenciada pela idade, gênero e menopausa. Lahoz *et al.* (2005) descreveram que o polimorfismo *LDLR* Avall está relacionado com maior resposta à pravastatina.

Variantes genéticas da HMGCR, o alvo terapêutico das vastatinas, são pouco estudadas. O estudo Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE) identificou duas variantes nesse gene relacionadas com a magnitude da resposta do LDL-C a pravastatina. Os SNPs *HMGCR* 12 (rs17244841) e 29 (rs17238540) foram relacionados com menores reduções de colesterol total e LDL-C séricos quando comparadas aos alelos comuns (CHASMAN *et al.*, 2004). Por outro lado, no estudo Atorvastatin Comparative Cholesterol Efficacy and Safety Study (ACCESS) não foi observada associação do SNP 29 com diferenças nas taxas de redução de colesterol total e LDL-C (THOMPSON *et al.*, 2005).

Polimorfismos em fatores de transcrição que regulam a homeostase intracelular do colesterol também parecem contribuir para a variabilidade na resposta as vastatinas. O polimorfismo *SREBF1a* -36delG foi relacionado com maior aumento de apo AI sérica em resposta a fluvastatina (SALEK *et al.*, 2002). Por outro lado, o polimorfismo *SREBF2* G1784C (rs4822063) não foi associado com diferenças na resposta à sinvastatina (FIEGENBAUM *et al.*, 2005a). Recentemente, demonstramos que a atorvastatina reduz a expressão de mRNA

de SCAP nos pacientes portadores do genótipo AA do polimorfismo *SCAP* A2386G (rs12487736) (ARAZI *et al.* 2008).

O polimorfismo *SCAP* A2386G também parece estar relacionado com a redução de colesterol total e triglicérides séricos após o tratamento com sinvastatina (FIEGENBAUM *et al.*, 2005a).

Os estudos sobre fatores genéticos associados com a resposta a ezetimiba são mais escassos. Polimorfismos no gene *NPC1L1* foram relacionados com a maior resposta terapêutica a ezetimiba (WANG A. *et al.*, 2005; SIMON *et al.*, 2005; HEGELE *et al.*, 2005). Pisciotta *et al.* (2007) observaram que a variante *NPC1L1* L272L (rs2072183) (C1679G) foi associada com maior redução de LDL-C após o tratamento com ezetimiba em indivíduos portadores de HF heterozigótica.

Como visto anteriormente, a concentração plasmática de colesterol é regulada por um conjunto de processos metabólicos complexos que envolvem a participação de proteínas e enzimas envolvidas na absorção, síntese, transporte, captação e eliminação do colesterol. As proteínas LDLR, HMGCR e *NPC1L1*, envolvidas nesses processos, são reguladas pelas proteínas SREBPs e SCAP que são expressas em maior quantidade quando há depleção de colesterol nas células. Além disso, numerosos fatores genéticos podem influenciar a concentração plasmática do colesterol e a resposta terapêutica, aumentando o risco para doenças cardiovasculares.

Considerando a importância das informações descritas e os escassos trabalhos publicados nesta área envolvendo indivíduos brasileiros, é de interesse conhecer o papel de variantes em genes envolvidos na homeostase intracelular

do colesterol na expressão gênica e na resposta a hipolipemiantes e também avaliar os efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão destes genes.

Os resultados deste estudo poderão contribuir para o conhecimento de fatores e mecanismos envolvidos na variabilidade de resposta aos hipolipemiantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em indivíduos hipercolesterolêmicos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina sobre a expressão do mRNA dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* em células mononucleares periféricas de indivíduos com hipercolesterolemia não familiar

2.2.2. Avaliar o efeito de polimorfismos dos genes *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* sobre a expressão do mRNA em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com hipercolesterolemia não familiar tratados com atorvastatina.

2.2.3. Avaliar o efeito de polimorfismos dos genes *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* sobre os valores de lípides basais e após a terapia com atorvastatina em pacientes com hipercolesterolemia não familiar.

2.2.4. Avaliar o efeito do tratamento com sinvastatina e ezetimiba sobre a expressão do mRNA dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em células mononucleares periféricas de indivíduos com hipercolesterolemia familiar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico

Foram selecionados 125 indivíduos normolipidêmicos (NL) entre 40 e 70 anos, apresentando concentrações séricas de colesterol total inferiores a 200 mg/dL, triglicérides inferiores a 150 mg/dL e LDL-C inferiores a 160mg/dL. Também foram selecionados 72 indivíduos com hipercolesterolemia não-familiar (HNF) entre 40 e 70 anos com indicação para o uso de atorvastatina (colesterol total > 200 mg/dL, triglicérides < 350 mg/dL, LDL-C > 160mg/dL). Ambos os grupos de indivíduos foram selecionados randomicamente entre os atendidos na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da USP (HU-USP).

No Ambulatório de Dislipidemias do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas de São Paulo foram selecionados 25 indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) com base nos critérios de histórico familiar e clínico, exames físicos (xantomas, xantelasmas, etc.) e análises laboratoriais e genéticas (CIVEIRA, 2004). A pesquisa de mutações do gene do *LDLR* associadas com a HF foi empregando-se o método de polimorfismo de conformação de fita única (SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*). As amostras com perfil de SSCP alterado foram analisadas por seqüenciamento de DNA para identificação da mutação conforme previamente descrito por nosso grupo de pesquisa (SALAZAR *et al.* 2002a; SALAZAR *et al.* 2002b).

Neste estudo, não foram incluídos os indivíduos com hipotireoidismo (TSH > 4,00 mcUI/mL), diabetes melito (glicose > 100mg/dL), doenças hepáticas (ALT > 43 U/L e AST > 35 U/L) e renal (creatinina > 1,3 mg/dL) graves, e mulheres em uso de contraceptivos orais ou grávidas.

Os indivíduos do grupo HNF fizeram uso de atorvastatina (10 mg/dia/via oral) durante quatro semanas após permanecerem quatro semanas sem medicação hipocolesterolêmica e em dieta com baixo teor gordura saturada e colesterol. (CHAHOUDE; AUDE; MEHTA, 2004).

Os indivíduos do grupo HF em prevenção primária de DAC permaneceram por quatro semanas sem medicação hipocolesterolêmica, de acordo com critério clínico, e fizeram uso de dieta com baixo teor gordura saturada e colesterol. Após esse período, os pacientes fizeram uso de sinvastatina (40 mg/dia/via oral) por quatro semanas e, a seguir, fizeram uso de sinvastatina (40mg/dia/via oral) e ezetimiba (10 mg/dia/via oral) por mais quatro semanas.

3.2 Amostras biológicas

Os indivíduos do grupo NL foram submetidos a uma única coleta de sangue, após jejum de 12 a 14 horas. Nessa coleta foram obtidos 15 mL de sangue em tubo com EDTA K2 (1,8 mg/mL de sangue) para extração de DNA e RNA e outro de 5 mL em tubo sem anticoagulante para a obtenção de soro. No soro, foram determinadas as concentrações de colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteínas AI (apoAI) e B (apoB), ALT, AST e CK, glicose, uréia, creatinina, TSH (hormônio tireoestimulante) e T4L (tiroxina livre).

Os indivíduos dos grupos HF e HNF foram submetidos a coletas de sangue adicionais (12 a 14 h de jejum), após cada fase do protocolo terapêutico. Em cada coleta, foram obtidos 10 mL de sangue em tubo com EDTA K2 (1,8 mg/mL de sangue) para extração de RNA e 5 mL em tubo sem anticoagulante para a obtenção de soro para determinação de concentrações de colesterol total e frações, triglicérides, apoAI, apoB, ALT, AST, CK, glicose, uréia, creatinina, TSH e T4L.

As concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicérides, apoAI e apoB foram utilizadas a fim de avaliar a resposta terapêutica aos hipolipemiantes. A avaliação de TSH e T4 livre foi utilizada para exclusão de pacientes com hipo ou hipertireoidismo. A glicemia foi determinada para excluir os indivíduos com diabetes melito. A dosagem de uréia e creatinina, a avaliação da atividade das enzimas ALT e AST e a avaliação de CK foram utilizadas para exclusão de pacientes com lesão renal, hepática, ou muscular respectivamente.

3.3 Determinações bioquímicas

As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triglicérides foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos (SIEDEL *et al.*, 1983; SUGIUCHI, *et al.*, 1995, SULLIVAN *et al.*, 1985) utilizando conjuntos diagnósticos (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), em analisador automático Advia 1650® (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA). A determinação de HDL-C foi realizada por método enzimático (NAUCK 1998) com o conjunto diagnóstico da DiaSys® (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemanha). As concentrações séricas de

VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald *et al.*(1972).

Amostras de soro foram enviadas ao Laboratório Álvaro, em Cascavel no estado do Paraná, para determinação das concentrações de apoAI (e apoB por métodos nefelométricos (RIFAI 1986) utilizando conjuntos diagnósticos da Dade Behring (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha), em analisador automático BN II® (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha). Este laboratório é membro participante dos programas PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade) , PALC (Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos) PELM (Proficiência em Ensaios Laboratoriais).

O índice aterogênico do plasma (AIP) calculado como $\log (TG/HDL-C)$ também foi avaliado. O AIP foi proposto como marcador de aterogenicidade do plasma porque está aumentado em indivíduos com alto risco para DAC e é inversamente proporcional ao tamanho da partícula de LDL (DOBIASOVA; FROHLICH, 2001). Rasouli *et al.* (2006) sugeriram que a relação apoB/apoAI é um fator de risco independente para DAC e é superior a outros índices sendo o melhor marcador de risco de DAC na prática clínica. O índice LDL-C/apoB é conhecido como um marcador indireto da subclasse de LDL densa e pequena e baixos índices desse parâmetro estão relacionados com DAC.(PACKARD; CASLAKE; SHEPERD, 2000)

As atividades das enzimas (ALT, AST e CK) e a concentração de uréia foram determinadas por métodos cinéticos (BERGMEYER; SCHEIBE; WAHLEFELD, 1978; HORDER *et al.*, 1991; TALKE 1965). As dosagens de glicose e creatinina foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos

(FABINY 1971; TRINDER, 1969). Estas análises também foram realizadas em analisador automático Advia 1650® (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA).

3.4 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do sangue total periférico, colhido com EDTA, usando o procedimento desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). A integridade das amostras foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) durante 30 minutos a 100V e 60mA, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A visualização das bandas foi feita em transluminador UV utilizando o sistema de captura de imagem Chemilmager 4400 (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} ((SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.5 Análise dos polimorfismos genéticos

Foram estudados as variantes dos genes *SREBF1* -36delG (região promotora), *SREBF2* G1784C (A595G exon 10, rs2228314 do banco dnSNP) e *SCAP* A2386G (Ile796Val ,exon 16, rs12487736 do banco dnSNP), empregando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os produtos gerados foram digeridos com enzimas de restrição específicas e o perfil de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) foi avaliado por técnica eletroforética.

Para o polimorfismo *SREBF1a* -36delG foram utilizados os iniciadores previamente descritos (VEDIE *et al.*, 2001, ARAZI *et al.*, 2008). Para os polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G foram desenhados iniciadores com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA). Na Tabela 1, estão descritos os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR para os polimorfismos estudados.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR-RFLP

Polimorfismo	Seqüências dos Iniciadores	Tamanho do Produto de PCR	Referência
<i>SREBF1a</i> -36delG	5' CGAGGCTGGATAAAATGAAT 3' 5' CACACCTTCGATGTCGGTCA 3'	464 bp	VEDIE <i>et al.</i> , 2001
<i>SREBF2</i> G1784C	5'-GGGGGAGTAGAAGTCTATATCA-3' 5'-AGAACTGGCAAATCAAGCTA-3'	435 bp	----
<i>SCAP</i> A2386G	5'-TTCTGCAGGACATCGAGTG-3' 5'-AGAAGGGGCAAGGGAAAAG-3'	342 bp	ARAZI <i>et al.</i> 2008

Nota: www.ensembl.org Número de acesso: SREBF2: ENSG00000198911;

Nos ensaios de PCR, foram utilizados de 100 a 400 nM dos iniciadores (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amersham Biosciences, NJ, EUA), e 1 unidade de DNA polimerase e tampão de PCR [composição: Tris-HCl a 75mM pH 9.0, MgCl₂ a 2mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₂SO₄ a 20mM (Biotools, Madri, Espanha)], e 100 ng de DNA genômico em um volume total de 50 µL. A Tabela 2 resume as condições otimizadas de amplificação pela PCR para os polimorfismos estudados.

Tabela 2 - Condições de amplificação pela PCR para os polimorfismos *SREBF1a* - 36delG, *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G.

Polimorfismo	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Ciclos
<i>SREBF1a</i> -36delG	96°C/1 min	60°C/2 min	72°C/2 min	30
<i>SREBF2</i> G1784C	96°C/1 min	53°C/1 min	72°C/1 min	32
<i>SCAP</i> A2386G	95°C/1 min	58°C/1 min	72°C/1 min	38

Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) durante 30 minutos a 100V e 60mA, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).e documentados como descrito no item 3.4. Como referência, foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de PCR foram digeridos com endonucleases de restrição por 4h, em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C, em volume final de reação de 10 µL, nas condições apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições otimizadas para os ensaios de restrição dos produtos de PCR com endonucleases.

Polimorfismo	Endonuclease	Quantidade	Produtos de restrição
<i>SREBF1a</i> -36delG	<i>Apa I</i>	30 U	131, 333 bp
<i>SREBF2</i> G1784C	<i>Nae I</i>	4 U	185, 150, 98bp
<i>SCAP</i> A2386G	<i>Hpy CH4 IV</i>	2 U	152, 123, 67bp

Os produtos de digestão enzimática para o polimorfismo -36delG do *SREBF1a* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) durante 50 minutos a 100V e 60mA, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)., utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Os géis foram corados e documentados como indicado no item 3.4. Na figura 4, podem ser observados os genótipos G+G+ (linha 1), G+G- (linha 2) e G-G- (linha 3).

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP *SREBF1a* -36delG. Linha M: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 1: genótipo G+G+. Linha 2: genótipo G+G-. Linhas 3: genótipo G-G-.

Os produtos de digestão enzimática dos polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, com tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) utilizando-se o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Göttingen, Alemanha) e a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), nas condições: 120V, 16mA, 2 h e 30 min. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para

caracterizar os tamanhos dos fragmentos gerados pela restrição enzimática. Os géis foram, posteriormente, corados com nitrato de prata (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e documentados utilizando-se o sistema de digitalização de imagem (HP Scan Jet 3400C, Hewlett-Packard®, Hong Kong, China).

Nas figuras 5 e 6, são apresentados os perfis de RFLP dos polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G, respectivamente. A banda de 185bp observada na figura 5 indica a presença do sítio constitutivo para corte da endonuclease de restrição *NaeI* para o polimorfismo *SREBF2* G1784C. Podemos observar os genótipos CC (linha 2), GC (linha 1, 3 e 4) e GG (linha 5). Para o polimorfismo *SCAP* A2386G, observa-se os genótipos AA (linha 2), AG (linhas 1, 3 e 5) e GG (linhas 4 e 6). O corte da enzima no sítio constitutivo pode ser observado pela presença da banda de 152bp.

Figura 5 - Eletroforese em gel de acrilamida 10% dos perfis de RFLP do polimorfismo *SREBF2* G1784C. Trilha M: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp. Linha 2: genótipo CC; Linhas 1, 3 e 4: genótipo GC; Linha 5: genótipo GG.

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição do SNP *SCAP* A2386G. Linha M: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 2: genótipo AA. Linhas 1,3 e 5: genótipo AG. Linhas 4 e 6: genótipo GG.

3.6 Triagem de mutações dos genes *LDLR* e *APOB*

As mutações R3500Q e R3531C do gene *APOB* foram triadas utilizando o método PCR-RFLP de acordo com Cavalli *et al* (2000).

Para a triagem de mutações no gene *LDLR* nos indivíduos do grupo HF foi utilizada o método de SSCP. Os exons e a região promotora do *LDLR* foram amplificados utilizando-se os iniciadores descritos previamente (HOBBS *et al.*, 1992, Salazar *et al.*, 2002). Brevemente, foram utilizados 100 nM de iniciadores (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mM de dNTPs (Amersham Biosciences, NJ, EUA), e 1 unidade de DNA polimerase e tampão de PCR (composição: Tris-HCl a 75mM pH 9.0, MgCl₂ a 2mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₂SO₄ a 20mM (Biotools, Madri, Espanha), e 100 ng de DNA genômico em um volume total de 50 µL. Os ensaios foram realizados utilizando-se o programa de amplificação: (1) ciclo inicial de 98°C por 3 min.; 30-35 ciclos de 95°C por 60 s, 55-68°C por 120 s, e 72°C por 60 s; e etapa de extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram avaliados conforme descrito no item 3.5.

Os produtos de PCR foram desnaturados e separados em condições não-desnaturantes utilizando-se o sistema GenePhor™ (GE Health Care, Chalfont St. Giles, Reino Unido). Resumidamente, 1µL de produto de PCR foi diluído em 20µL de solução desnaturante (formamida a 95%, EDTA a 10mM, xilenocianol a 0,05% e azul de bromofenol a 0,05%), submetido à desnaturação por 8 min a 95°C e imediatamente transferido para banho de gelo. A seguir, 5 µL dessa mistura foram submetidos à separação eletroforética no equipamento GenePhor™, utilizando o Kit comercial GeneGel Excel 12.5/24 (GE Health Care, Chalfont St. Giles, Reino Unido) que inclui os tampões de eletroforese e os géis de poliacrilamida a 12,5%. A seguir, os géis foram revelados pela coloração com nitrato de prata e a documentação foi feita como descrito no item 3.5.

3.7 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi utilizado para identificar as mutações detectadas pelo SSCP. Resumidamente, os produtos de PCR com perfil de SSCP alterado foram purificados utilizando-se o kit GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (GE Health Care, Chalfont St. Giles, Reino Unido), de acordo com o protocolo do fabricante. A seguir, foram submetidos à reação de seqüenciamento utilizando-se o kit comercial DYEnamic ET Dye Terminator Kit com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase (GE Health Care, Chalfont St. Giles, Reino Unido) de acordo com as instruções do fornecedor e separados no sistema de eletroforese de alta resolução MegaBace 1000 (GE Health Care, Reino Unido).

Para análise das seqüências foi utilizado o programa BioEdit (Carlsbad, CA, EUA), os eletroferogramas e a seqüência de referencia (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/refseq/>).

3.8 Extração e avaliação do RNA total de células mononucleares

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, MO, USA) densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (SALAZAR *et al.*, 2000). Resumidamente, em tubos cônicos de 15 mL de capacidade, foram pipetados 10 mL de sangue humano com EDTA (1mg/mL), diluídos com igual volume de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl a 10mM, pH 7,4 e EDTA a 10mM, pH 8,0), sobre 3 mL de Ficoll-Hypaque. O tubo foi centrifugado a 800 *g* por 30 min. a temperatura ambiente e a camada de células mononucleares foi recolhida. As células foram lavadas com tampão Tris-EDTA contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

As CMSP (1 a 5×10^6 células/mL) foram lisadas com 1 mL de TRIZOL^R (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com procedimento previamente padronizado em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 2000; MASSIRER *et al.*, 2004). Resumidamente, 200 μ L de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados 12.000 x *g* por 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x *g*, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μ L água esterilizada tratada com (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, USA), e armazenado a -70°C para posterior análise.

O RNA extraído foi quantificado ($A_{260\text{nm}}$) e foi avaliado o grau de pureza (A_{260}/A_{280}) por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo formaldeído a 2,2M e tampão MOPS [MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] preparado com água esterilizada tratada com DEPC (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Os valores de concentração do RNA total extraído estão descritos na tabela 4. As concentrações médias de RNA total foram similares entre os grupos de indivíduos ($p = 0,675$). A razão 260/280 nm determina o grau de pureza de um ácido nucléico. Para amostras de RNA, a faixa dessa razão deve estar entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 4 - Dados de quantificação das amostras de RNA obtidas de células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos estudados

Grupos	Fases do tratamento	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
HF (25)	Basal	$427,1 \pm 221,1$
	Sinvastatina	$368,9 \pm 237,6$
	Sinvastatina + Ezetimiba	$488,7 \pm 318,5$
HNF (72)	Basal	$441,8 \pm 273,5$
	Atorvastatina	$447,2 \pm 286,4$
NL (125)	Sem tratamento	$391,8 \pm 209,1$

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HF: hipercolesterolêmicos familiar; HNF: hipercolesterolêmicos não familiar; NL: normolipidêmicos; Sinva: sinvastatina; Eze: ezetimiba; Atorva: atorvastatina. Teste: ANOVA on Ranks ($p < 0,001$) e o método de Dunn para comparação múltipla dos pares [$p < 0,05$ para: Sinva x Sinva+Eze, Basal (HNF) x Sinva, NL x Sinva, Atorva x Sinva].

3.9 Análise da expressão do mRNA por RT-PCR em tempo real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *LDLR*, *HMGCR* e *NPC1L1* em CMSP, foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A primeira etapa consistiu da síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 µM dNTP 10 mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™ II RT RNase H⁻) e tampão de RT (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM) (Invitrogen, MD, EUA). A mistura foi incubada por 10 min a 25°C, seguida de 50 min a 42°C e 15 min a 70°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Na segunda etapa, o cDNA de cada gene foi amplificado por PCR em tempo real, utilizando-se iniciadores (concentração final: 900 nM) e sondas de detecção marcadas com FAM (concentração final: 250 nM) adquiridos no formato "*TaqMan Gene expression Assays*" que contém os iniciadores e a sonda de cada gene prontos para serem utilizados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e identificados pelos números de catálogo de acordo com a tabela 5:

Tabela 5 - Número de catálogo dos ensaios utilizados (iniciadores + sonda)

Gene	Número de catálogo
<i>SREBF1a</i>	Hs00231674_m1
<i>SREBF2</i>	Hs00190237_m1
<i>SCAP</i>	Hs00299593_m1
<i>HMGCR</i>	Hs00168352_m1
<i>LDLR</i>	Hs00181192_m1

Os demais reagentes de PCR foram adquiridos em solução denominada *Master Mix* (MgCl_2 25 mM, dNTPs 10 mM, AmpErase^R UNG 30U, enzima AmpliTaq Gold 150 U e tampão de reação) (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA). Para uso, essa solução foi diluída 2 vezes. Foi utilizado volume final de 25 μL por reação e os ensaios foram realizados em duplicata.

Para o gene *NPC1L1*, foram sintetizados iniciadores e sonda separadamente devido à baixa expressão desse gene nas CMSP. Após otimização a concentração da sonda escolhida foi de 300 nM e dos iniciadores de 200 nM.

O programa de PCR em tempo real foi constituído de: (1) um ciclo 2 min a 50°C, (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95°C, (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa 7500

System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) que geram curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo *threshold* (C_t) (KUBISTA 2006; BUSTIN; MUELLER, 2005). Para cada amostra cDNA, o C_t de cada gene é registrado e comparado com o do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPD*) que é utilizado como controle endógeno.

A escolha do controle endógeno foi feita avaliando 6 genes diferentes (*GAPD*, *HRPT1*, *SDHS*, *HMBS*, *B2M* e *UBC*) em uma amostragem de cDNAs que incluíram pacientes normolipidêmicos, hipercolesterolêmicos não tratados e tratados. Após a reação de PCR em tempo real, os dados foram analisados no programa geNorm (PrimerDesign Ltd.). Os genes com menor variação entre as amostras foram *GAPD* e *HRPT1*. O *GAPD* foi o gene escolhido pela disponibilidade do produto.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) de cDNA de amostras usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de C_t foram plotados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (C_t x log da diluição de cDNA).

A eficiência da reação é calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$, onde α é a inclinação da curva (PFAFFL, 2001). Segundo Livak e Schmittgen (2001), para um ensaio de PCR

em tempo real ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (do inglês *slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Quando esses critérios não são atendidos, é preciso verificar as concentrações de iniciadores e sondas em outras curvas-padrão.

Na tabela 6, são apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios.

Tabela 6 - Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de RT-PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
<i>SREBF1a</i>	- 3,30	100%
<i>SREBF2</i>	- 3,38	98%
<i>SCAP</i>	- 3,46	95%
<i>HMGCR</i>	- 3,09	110%
<i>LDLR</i>	- 3,53	91%
<i>NPC1L1</i>	- 3,26	103%
<i>GAPD</i>	- 3.43	96%

O cDNA das amostras de pacientes foi diluído 1:4 que corresponde à quantidade de cDNA intermediária nas curvas-padrão para a maioria dos genes. Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta Ct}$) para a análise dos dados.

3.10 Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP e RT-PCR

As amplificações realizadas pela técnica de PCR foram monitorizadas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto a amostra de DNA ou cDNA) em cada conjunto de reações. Os ensaios de RT-PCR em tempo real para cada amostra foram realizados em duplicata.

Os produtos de PCR-RFLP dos polimorfismos G1784C do *SREBF2* e A2386G do *SCAP* apresentam em sua seqüência um sítio de reconhecimento da enzima de restrição, denominado sítio constitutivo, que permite a avaliação da atividade enzimática durante a reação de restrição, sendo um controle útil da reação. Os produtos de PCR-RFLP do polimorfismo -36delG do *SREBF1a* não apresentavam um sítio constitutivo, porém, amostras controles para os três genótipos possíveis foram analisadas juntamente com as amostras testadas. Também foram repetidos 20% dos testes de PCR-RFLP para cada polimorfismo, aleatoriamente.

3.11 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados através dos softwares Minitab 15 (Minitab State College, Pennsylvania, EUA), SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e Sigma Stat versão 3.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. As posições ANOVA (analysis of variance) foram avaliadas a normalidade, a independência de erros e a homocedasticidade.

Para comparar as frequências das variáveis qualitativas foi realizado o teste de qui-quadrado. Para comparar os valores de variáveis quantitativas entre

os grupos foram utilizados os testes ANOVA e *t* de Student. Para comparar as fases do tratamento foi utilizado o teste *t* pareado ou a ANOVA para medidas repetidas. O teste Tukey foi utilizado para as comparações múltiplas nos testes de ANOVA, considerando 95% de intervalo de confiança.

Para avaliar a influência dos polimorfismos na expressão de mRNA, foram utilizados os testes teste *t* de Student, ANOVA e Tukey para a comparação múltipla de pares.

4. RESULTADOS

4.1 Análise molecular dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar

Foram realizados testes moleculares para detectar mutações no gene *LDLR* dos 25 indivíduos HF selecionados para o estudo. Na figura 7, estão ilustrados alguns exemplos de perfis de SSCP alterados que indicam a presença da mutação e a confirmação por seqüenciamento de DNA. Foram encontradas mutações no gene *LDLR* em 10 indivíduos HF, como apresentado na tabela 7. Não foram encontradas mutações nos outros 15 pacientes pela PCR-SSCP.

As amostras de DNA dos indivíduos HF foram também testadas para a presença de mutações R3500Q e R3531C do gene *APOB*. Estas mutações conferem o fenótipo de Defeito de apoB-100 familiar, doença monogenética com fenótipo similar a hipercolesterolemia familiar heterozigótica. Não foram encontradas mutações do *APOB* neste grupo amostral.

Figura 7- Mutações encontradas no exon 5 do gene *LDLR*. NL: normolipidêmicos

Tabela 7 - Mutações no gene *LDLR* detectadas em indivíduos com HF

Número do indivíduos	Nucleotídeo	Evento	Nome da mutação	Exon	Referência
1EZ	1118	G>A	G373D	8	BERTOLINI et. al. 1999
4 EZ	757	C>T	R253W	5	FOUCHIER et. al. 2001
6 EZ	769	C>T	R257W	5	NAUCK et. al.2001
7 EZ	2093	G>A	C677Y	14	SCHMIDT; KOSTNER, 1997 ^a
8 EZ	2093	G>A	C677Y	14	SCHMIDT; KOSTNER ,1997 ^a
9 EZ	2093	G>A	C677Y	14	SCHMIDT; KOSTNER, 1997 ^a
15 EZ	670	G>A	D224N	4	HOBBS et. al. 1992
16 EZ	670	G>A	D224N	4	HOBBS et. al. 1992
49 EZ	670	G>A	D224N	4	HOBBS et. al. 1992
50 EZ	1740	G>C	D580H	12	SALAZAR et. al. 2002

Nota: Indivíduos 7EZ, 8EZ e 9EZ são irmãos; indivíduos 15EZ e 16EZ são irmãos, 49EZ é primo dos indivíduos 15EZ e 16EZ. ^a Comunicações pessoais (<http://www.ucl.ac.uk/fh>)

4.2 Efeitos de hipolipemiantes sobre o perfil lipídico

Na Tabela 8, são apresentados dados biodemográficos e de perfil lipídico sérico basal dos grupos HF, HNF e NL. Observou-se maior frequência de mulheres em todos os grupos. Além disso, foram observadas mais mulheres no grupo HF (92,0%) em relação aos outros dois grupos (HNF: 65,8% e NL: 72,9%, $p=0,020$). As médias de idade foram maiores nos grupos de hipercolesterolêmicos (HF e HNF) em relação aos normolipidêmicos ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação à frequência de hipertensão, etnia, obesidade e de valores de IMC entre os grupos estudados. O grupo HF apresentou maior porcentagem de indivíduos com histórico familiar de DAC do que os grupos HNF e NL. A porcentagem de pacientes com histórico familiar de DAC também foi maior no grupo HNF do que no grupo NL.

Os grupos HNF e HF tiveram concentrações séricas de CT, TG, LDL-C, VLDL-C e apoB basais maiores que as do grupo de normolipidêmicos ($p < 0,001$) indicando que a seleção dos indivíduos destes grupos foi adequada. Como esperado, observaram-se maiores concentrações séricas de CT, TG, LDL-C, VLDL-C e apoB no grupo HF comparando-se com o grupo HNF. O grupo HF apresentou menores concentrações séricas de HDL-C que os grupos HNF e NL. O índice aterogênico do plasma (AIP) e as razões apoB/apoAI e LDL-C/apoB dos grupos HNF e HF foram maiores que no grupo NL ($p<0,001$). Assim como as concentrações de lípidos, estes índices também foram significativamente maiores no grupo HF do que no grupo HNF.

Tabela 8 - Características biodemográficas e valores de lipídeos séricos basais dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), hipercolesterolemia não-familiar (HNF) e normolipidemia (NL)

Parâmetros	HF (25)	HNF (72)	NL (125)	p
Gênero Feminino (%)	92,0% (23) ^a	66,7% (48) ^b	72,8 % (91) ^{a,b}	0,028
Caucasianos (%)	72,0% (18)	69,4% (50)	60,0% (75)	0,289
Obesidade (%) (IMC >30 kg/m ²)	13,0% (3)	26,8 % (19)	18,2 % (22)	0,237
IMC (kg/m ²)	26,7 ± 3,8	27,9 ± 3,8	26,5 ± 4,4	0,113
Idade (anos)	52,3 ± 12,6 ^a	53,4 ± 9,5 ^a	46,8 ± 6,8 ^b	<0,001
Hipertensão (%)	45,5% (10)	49,3 % (35)	40,2 % (49)	0,461
Histórico familiar de DAC (%)	70,8 % (17) ^a	54,3% (38) ^{a,c}	43,4 % (53) ^{b,c}	0,031
<i>Perfil lipídico (mg/dL)</i>				
Colesterol total	332 ± 62 ^a	272 ± 29 ^b	173 ± 18 ^c	<0,001
Triglicérides	194 ± 138 ^a	145 ± 58 ^b	82 ± 28 ^c	<0,001
HDL-C	44 ± 12 ^a	60 ± 13 ^b	59 ± 13 ^b	<0,001
LDL-C	258 ± 59 ^a	183 ± 25 ^b	98 ± 19 ^c	<0,001
VLDL-C	39 ± 28 ^a	29 ± 12 ^b	16 ± 6 ^c	<0,001
apoAI	149 ± 25	143 ± 30	143 ± 28	0,612
apoB	178 ± 48 ^a	141 ± 33 ^b	86 ± 24 ^c	<0,001
apoB/apoAI	1,23 ± 0,35 ^a	1,06 ± 0,42 ^a	0,63 ± 0,23 ^b	<0,001
LDL-C/apoB	1,43 ± 0,48 ^a	1,34 ± 0,27 ^a	1,19 ± 0,29 ^b	<0,001
AIP	0,61 ± 0,26 ^a	0,36 ± 0,23 ^b	0,13 ± 0,21 ^c	<0,001

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. NL: normolipidêmicos; HNF: hipercolesterolêmicos não familiar; IMC: Índice de massa corpórea; 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; AIP: índice aterogênico do plasma. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2). a,b,c Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes

Os valores das concentrações séricas dos lipídeos de indivíduos HNF antes e após o tratamento com atorvastatina estão descritos na tabela 9 (figura 8). Como esperado, observou-se redução significativa nos valores de colesterol total e LDL-C ($p < 0,001$). Após o tratamento com atorvastatina, também foram observadas reduções significativas das concentrações de HDL-C, TG, VLDL-C e apoB assim como reduções nos índices apoB/apoAI, LDL-C/apoB e AIP

($p < 0.001$). Observou-se um aumento, porém não significativo nas concentrações de apoA1 após o tratamento. ($p = 0,057$).

Tabela 9 - Valores das concentrações séricas dos lipídeos do pacientes hipercolesterolêmicos do grupo HNF, antes e após o tratamento com atorvastatina.

Perfil lipídico (mg/dL)	Basal (72)	Atorva (72)	% <i>variação</i>	<i>P</i>
Colesterol total	272 ± 29	195 ± 26	- 27,9 %	< 0.001
Triglicérides	145 ± 58	123 ± 49	- 11,2 %	< 0.001
HDL-C	60 ± 13	57 ± 12	- 4,6 %	< 0.001
LDL-C	183 ± 25	113 ± 23	- 37,7 %	< 0.001
VLDL-C	29 ± 12	25 ± 10	- 11,2 %	< 0.001
apoA1	142 ± 30	147 ± 27	+ 6,8 %	0.057
apoB	143 ± 32	96 ± 21	- 33,7 %	< 0.001
apoB/apoA1	1,06 ± 0,42	0,67 ± 0,17	-30,6 %	< 0.001
LDL/apoB	1,34 ± 0,27	1,18 ± 0,23	- 9,6%	< 0.001
AIP	0,36 ± 0,23	0,31 ± 0,24	- 20,8 %	< 0.001

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HNF: hipercolesterolêmicos não-familiar. Atorva: atorvastatina. 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; AIP: índice aterogênico do plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t pareado

Figura 8 - Concentrações séricas dos lipídeos de pacientes hipercolesterolêmicos do grupo HNF antes e após o tratamento com atorvastatina. CT: colesterol total; TG: triglicérides; 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. Os resultados apresentados como média ± desvio padrão e comparados por teste t de student.

Os valores das concentrações séricas dos lipídeos de pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF) antes, após o tratamento com sinvastatina em monoterapia (S) e combinada com ezetimiba (SE) estão descritos na tabela 10 (figura 9). Como esperado, observou-se redução significativa nos valores de colesterol total, LDL-C e apoB com o tratamento em ambas as fases. A terapia combinada de sinvastatina e ezetimiba reduziu significativamente mais as concentrações séricas de CT, LDL-C e apoB em relação à terapia da sinvastatina em monoterapia ($p < 0,001$). Os índices LDL-C/apoB e apoB/apoAI também sofreram reduções significativamente maiores na terapia combinada ($p=0,028$ e $p<0,001$ respectivamente). A terapia combinada aumentou significativamente as concentrações de apoAI, quando comparada com a fase sem tratamento ($p=0.023$).

Tabela 10 - Valores das concentrações séricas dos lipídeos do pacientes hipercolesterolêmicos do grupo HF, antes (basal) e após o tratamento com sinvastatina isolada (Sinva) e em associação com ezetimiba (Sinva+Eze).

Perfil lipídico (mg/dL) *	Basal (25)	Sinva (25)	Sinva+Eze (25)	<i>P</i> *	Basal vs Sinva	Basal vs Sinva+Eze	<i>P</i> **
Colesterol total	332 ± 62 ^a	231 ± 39 ^b	194 ± 31 ^c	< 0.001	-29,5 %	- 40,4 %	< 0.001
Triglicérides	194 ± 138 ^a	146 ± 87 ^b	145 ± 71 ^b	< 0.001	- 17,4 %	- 16,8 %	0.922
HDL-C	44 ± 12 ^a	47 ± 13 ^b	48 ± 13 ^b	< 0.001	+11,8%	+ 12,2 %	0.895
LDL-C	258 ± 59 ^a	154 ± 35 ^b	117 ± 28 ^c	< 0.001	- 38,8%	- 53,4 %	< 0.001
VLDL-C	39 ± 28 ^a	29 ± 17 ^b	29 ± 14 ^b	< 0.001	- 17,4 %	- 16,8 %	0.922
apoAI	149 ± 25 ^a	146 ± 24 ^a	155 ± 28 ^b	0,049	- 1,0 %	+ 4,5 %	0.023
apoB	178 ± 48	113 ± 29	96 ± 26	< 0.001	- 35,0 %	- 45,9 %	< 0.001
apoB/apoAI	1,23 ± 0,35	0,79 ± 0,23	0,65 ± 0,22	< 0.001	- 35,1 %	- 47,1%	< 0.001
LDL/apoB	1,43 ± 0,48 ^a	1,40 ± 0,24 ^a	1,25 ± 0,27 ^b	0,043	- 3,4 %	- 11,5%	0,028
AIP	0,61 ± 0,26 ^a	0,44 ± 0,29 ^b	0,45 ± 0,26 ^b	< 0.001	- 29,1 %	-27,6 %	0.839

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. B: basal, B: sinvastatina. 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. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por: ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, e **teste t pareado (Basal/Sinva vs. Basal/Sinva+Eze). a,b,c Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes

Figura 9 - Concentrações séricas dos lípidos de pacientes hipercolesterolêmicos do grupo HF antes e após o tratamento com sinvastatina (Sinva) e sinvastatina com ezetimiba (Sinva + Eze). CT: colesterol total; TG: triglicérides; 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. Os resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão e comparados por teste t de student.

4.3 Efeitos de hipolipemiantes sobre a expressão gênica em CMSP

Na figura 10 (tabela 11), são apresentados os valores médios e o intervalo de confiança 95% de expressão do mRNA basal dos genes em estudo em CMSP

Observou-se maior expressão dos genes *HMGCR* e *LDLR* no grupo HF em comparação aos grupos HNF e NL (*HMGCR*: $p=0,002$, *LDLR*: $p<0,001$) A expressão do gene *NPC1L1* no grupo HF também foi maior em relação ao grupo NL ($p=0,012$). A expressão dos genes *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* foram similares entre os grupos estudados.

Figura 10 - Expressão basal de mRNA dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* em CMSP de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), não-familiar (HNF) e normolipidêmicos (NL).

Tabela 11 - Expressão basal de mRNA dos genes estudados em CMSP de indivíduos dos grupos HF, HNF e NL

Genes	HF n=25	HNF n=72	NL n=125	P
<i>SREBF1a</i>	0,02010 ± 0,00335 (0,01353 – 0,02668)	0,01222 ± 0,00198 (0,00834 – 0,01609)	0,01427 ± 0,00150 (0,01132 – 0,01721)	0,129
<i>SREBF2</i>	0,02432 ± 0,00684 (0,01091 – 0,03733)	0,02727 ± 0,00403 (0,01936 – 0,03517)	0,02819 ± 0,00306 (0,02219 – 0,03418)	0,874
<i>SCAP</i>	0,09140 ± 0,02239 (0,04751 – 0,13529)	0,07981 ± 0,01320 (0,05395 – 0,10568)	0,11081 ± 0,01002 (0,09118 – 0,13044)	0,164
<i>HMGCR</i>	0,03944 ± 0,00632 ^a (0,02706 – 0,05181)	0,01554 ± 0,00372 ^b (0,00825 – 0,02284)	0,01567 ± 0,00282 ^b (0,01013 – 0,02121)	0,002
<i>LDLR</i>	0,04784 ± 0,00731 ^a (0,03350 – 0,06218)	0,01495 ± 0,00431 ^b (0,00650 – 0,02339)	0,01740 ± 0,00327 ^b (0,01100 – 0,02381)	<0,001
<i>NPC1L1</i>	0,00420 ± 0,00138 (0,00149 – 0,00691)		0,00020 ± 0,00080 (0,00136 – 0,00177)	0,012

Nota: HF: hipercolesterolemia familiar; HNF: hipercolesterolemia não-familiar; NL: normolipidêmicos. Valores de expressão apresentados como média ± desvio padrão e o estatístico que gerou estes resultados assim (95% IC). Os resultados foram comparados por ANOVA. a,b, Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes

A Figura 11 e a tabela 12 ilustram a variação de expressão gênica (mediana, distância 5-95% e os valores extremos), em CMSP de indivíduos do grupo HNF, antes (*box* azuis) e após (*box* vermelhos) o tratamento com atorvastatina. Não se observou diferença significativa na expressão gênica após o tratamento com este medicamento.

Figura 11 - Box plots de valores de expressão normalizada dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR* e *LDLR* em CMSP do grupo HNF, antes e após o tratamento com atorvastatina. Os Box plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos).

Tabela 12 - Variação da expressão de mRNA dos genes estudados em CMSP de indivíduos HNF tratados com atorvastatina

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	Atorva ($2^{-\Delta Ct}$)	P
<i>SREBF1a</i>	0,01222 $\pm$ 0,01359	0,01335 $\pm$ 0,01981	0,503
<i>SREBF2</i>	0,02727 $\pm$ 0,03180	0,02912 $\pm$ 0,03138	0,658
<i>SCAP</i>	0,07981 $\pm$ 0,08918	0,07438 $\pm$ 0,07636	0,570
<i>HMGCR</i>	0,01554 $\pm$ 0,01925	0,02023 $\pm$ 0,02794	0,055 ^a
<i>LDLR</i>	0,01496 $\pm$ 0,01998	0,02997 $\pm$ 0,09241	0,115 ^a

Nota: ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Atorva: atorvastatina; HNF: hipercolesterolemia não-familiar. Valores de expressão apresentados como média $\pm$ DP. Os resultados foram comparados por teste t pareado

A Figura 12 e a tabela 13 ilustram a variação de expressão gênica (mediana, distância 5-95% e os valores extremos), em CMSP de HF, antes (box azuis), após o tratamento com sinvastatina (box vermelhos) e após o tratamento com sinvastatina e ezetimiba (box verdes). Não se observou diferença significativa na expressão gênica após o tratamento ambos os esquemas de tratamento.

Figura 12 - Box plots de valores de expressão normalizada dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* em CMSP do grupo HF, antes e após o tratamento com sinvastatina e sinvastatina combinada com ezetimiba. Os Box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos).

Tabela 13 - Variação da expressão de mRNA dos genes estudados em CMSP de indivíduos HF tratados com sinvastatina combinada ou não com ezetimiba

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	Sinva ($2^{-\Delta Ct}$)	Sinva + Eze ($2^{-\Delta Ct}$)	P
<i>SREBF1a</i>	0,02010 $\pm$ 0,01829	0,04439 $\pm$ 0,13196	0,04034 $\pm$ 0,07358	0,423
<i>SREBF2</i>	0,02432 $\pm$ 0,02205	0,02216 $\pm$ 0,01864	0,03441 $\pm$ 0,04846	0,342
<i>SCAP</i>	0,09140 $\pm$ 0,09818	0,12906 $\pm$ 0,15578	0,15396 $\pm$ 0,19261	0,323
<i>HMGCR</i>	0,03943 $\pm$ 0,08196	0,03342 $\pm$ 0,07211	0,03460 $\pm$ 0,05298	0,946
<i>LDLR</i>	0,04784 $\pm$ 0,10035	0,01919 $\pm$ 0,10035	0,04609 $\pm$ 0,08749	0,330
<i>NPC1L1</i>	0,00420 $\pm$ 0,01409	0,00720 $\pm$ 0,01935	0,01193 $\pm$ 0,03398	0,121

Nota: ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. HNF: hipercolesterolemia não-familiar; sinva: sinvastatina; sinva+eze: sinvastatina combinada com ezetimiba. Valores de expressão estão apresentados como média $\pm$ DP.e resultados foram comparados por ANOVA.

Na figura 13, são apresentados os resultados da análise de correlação entre os valores de expressão de mRNA dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *LDLR* e *HMGCR* normalizados com o controle endógeno *GAPD* dos indivíduos do grupo HNF, após o tratamento com atorvastatina. Observa-se moderada correlação positiva (r : 0.281 a 0.521, $p < 0,05$) entre os valores encontrados. Estes resultados são sugestivos de que a atorvastatina regula a expressão desses genes simultaneamente nos indivíduos HNF.

Figura 13 - Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA ($\Delta C t_{\text{atorva}} - \Delta C t_{\text{basal}}$) em CMSP após o tratamento com atorvastatina. A: Correlação entre o mRNA de *SREBF1a* e *SREBF2*. B: Correlação entre o mRNA de *SREBF1a* e *SCAP*. C: Correlação entre o mRNA de *SREBF1a* e *LDLR*. D: Correlação entre *SREBF2* e *SCAP*. E: Correlação entre *SREBF2* e *LDLR*. F: Correlação entre *LDLR* e *HMGCR*.

No grupo HNF, observou-se grande variabilidade na expressão de mRNA basal em CMSP, sendo que os indivíduos com menores valores basais tiveram aumento de expressão, após o tratamento, e aqueles com maiores valores basais tiveram a expressão diminuída. Em razão desta variabilidade, os dados foram separados nos grupos A e D para cada gene, onde A corresponde ao grupo com a expressão aumentada e D com a expressão diminuída após o tratamento. Os resultados desta análise são apresentados na figura 14. É possível observar diferenças na taxa de expressão basal e após tratamento entre os grupos A e D ($p < 0,05$) sugerindo que o efeito da atorvastatina sobre a expressão gênica é dependente do valor basal.

Com a finalidade de avaliar a possível relação entre os perfis de expressão e a resposta a atorvastatina, foram comparadas as porcentagens de variação nos lipídeos séricos para os grupos de expressão A e D, como é mostrado na figura 15. Não foi observada relação de diferença na expressão de mRNA para os genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *LDLR* e *HMGCR* e as diferenças no perfil lipídico sérico após o tratamento. Os indivíduos HNF com expressão do gene *SCAP* aumentada pela atorvastatina apresentaram maior redução do índice apoB/apoA1 quando comparada aos que tiveram a expressão diminuída com o tratamento.

Figura 14 - Valores de expressão de mRNA de *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *LDLR* e *HMGCR* em CMSP antes e após o tratamento com atorvastatina. Dados comparados por teste-t de student e teste t pareado. A: aumento da expressão; D: diminuição da expressão.

Figura 15 - Perfil lipídico sérico em resposta a atorvastatina de acordo com o padrão de expressão nos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR* e *LDLR* em pacientes do grupo HNF. CT: colesterol total, TG: triglicérides, HDL-C: colesterol da HDL, LDL-C: colesterol da LDL, VLDL-C: colesterol da VLDL, apoA1, apolipoproteína A1; apoB, apolipoproteína B.

Também foi investigado se a expressão basal dos genes estudados foi relacionada com os lipídeos séricos em resposta a atorvastatina. Os níveis de mRNA foram separados em quartis e as comparações entre eles das outras variáveis estão mostradas nas tabelas 14 a 18.

Observaram-se diferenças entre a expressão basal e a expressão após o tratamento em todos os genes estudados (*SREBF1a*, $p=0,009$; *SREBF2*, $p=0,015$; *SCAP*, $p=0,002$; *HMGCR*, $p=0,001$ e *LDLR*, $p<0,001$). Observou-se também que indivíduos com maior expressão basal de *HMGCR* apresentaram maiores concentrações séricas de apoAI após o tratamento com atorvastatina ($p=0,001$).

Tabela 14 - Relação entre a expressão de mRNA do *SREBF1a* em CMSP e a resposta a atorvastatina em pacientes do grupo HNF.

		Níveis de expressão basal de <i>SREBF1a</i>				p
		<0.0048 (18)	0.0051 - 0.0073 (18)	0.0077 - 0.0135 (18)	> 0.0138 (18)	
<i>SREBF1a</i> mRNA	Atorva	0,00844±0,00916	0,00868±0,00733	0,00950±0,00552	0,0268±0,0349	0,009
CT, mg/dL	Basal	268 ± 26	276 ± 41	269 ± 15	274 ± 30	0,828
	Atorva	188 ± 25	198 ± 33	196 ± 16	197 ± 27	0,640
	%	-29,7 ± 6,6	-27,6 ± 11,1	-26,9 ± 6,9	-27,5 ± 9,3	0,782
HDL-c, mg/dL	Basal	55 ± 9	61 ± 16	60 ± 14	63 ± 13	0,296
	Atorva	51 ± 10	57 ± 16	59 ± 11	60 ± 12	0,197
	%	-5,7 ± 12,3	-6,5 ± 9,7	-1,5 ± 7,8	-4,8 ± 7,15	0,407
LDL-c, mg/dL	Basal	182 ± 24	189 ± 34	176 ± 15	183 ± 22	0,501
	Atorva	109 ± 21	117 ± 28	111 ± 14	116 ± 26	0,654
	%	-39,9 ± 8,9	-37,4 ± 13,4	-36,8 ± 9,9	-36,8 ± 12,4	0,821
VLDL-c, mg/dL	Basal	31 ± 10	26 ± 10	31 ± 15	28 ± 10	0,468
	Atorva	27 ± 12	24 ± 8	26 ± 10	22 ± 8	0,449
	%	-15,4 ± 28,2	-7,5 ± 25,8	-6,2 ± 37,6	-15,6 ± 26,9	0,676
TG, mg/dL	Basal	157 ± 51	131 ± 49	155 ± 77	138 ± 51	0,468
	Atorva	133 ± 62	118 ± 42	131 ± 50	110 ± 38	0,449
	%	-15,4 ± 28,2	-7,5 ± 25,8	-6,2 ± 37,6	-15,6 ± 26,9	0,676
apoAI, mg/dL	Basal	138 ± 23	148 ± 35	142 ± 22	142 ± 38	0,827
	Atorva	142 ± 25	144 ± 26	151 ± 22	151 ± 33	0,651
	%	-3,0 ± 10,5	-1,0 ± 8,5	7,1 ± 7,8	17,6 ± 64,5	0,397
apoB, mg/dL	Basal	141 ± 26	148 ± 42	147 ± 30	136 ± 28	0,660
	Atorva	95 ± 22	93 ± 24	101 ± 17	96 ± 22	0,782
	%	-32,4 ± 6,4	-35,2 ± 14,9	-30,2 ± 10,2	-28,3 ± 15,5	0,392
apoB/apoAI	Basal	1,04 ± 0,23	1,03 ± 0,26	1,06 ± 0,3	1,11 ± 0,73	0,947
	Atorva	0,69 ± 0,18	0,66 ± 0,17	0,68 ± 0,13	0,66 ± 0,18	0,949
	%	-33,9 ± 7,6	-34,6 ± 14,0	-34,4 ± 10,5	-32,0 ± 22,2	0,951

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Valores apresentados como média ± DP e comparados por ANOVA.

Tabela 15 - Relação entre a expressão de mRNA do *SREBF2* em CMSP e a resposta a atorvastatina em pacientes do grupo HNF.

		Níveis de expressão basal de <i>SREBF2</i>				p
		<0.0058 (18)	0.0064 - 0.0195 (18)	0.0204 - 0.0312 (18)	> 0.0331 (18)	
<i>SREBF2</i> mRNA	Atorva	0,0163 ± 0,0231	0,0192 ± 0,0123	0,0370 ± 0,0415	0,0441 ± 0,0336	0,015
CT, mg/dL	Basal	272 ± 30	272 ± 30	265 ± 25	277 ± 33	0,686
	Atorva	194 ± 27	200 ± 23	197 ± 26	190 ± 27	0,687
	%	-28,7 ± 8,8	-25,8 ± 10,2	-25,8 ± 8,0	-31,5 ± 6,0	0,133
HDL-c, mg/dL	Basal	55 ± 10	60 ± 16	61 ± 13	62 ± 15	0,471
	Atorva	52 ± 9	56 ± 17	58 ± 9	60 ± 13	0,257
	%	-5,3 ± 8,2	-7,1 ± 13,2	-4,1 ± 8,3	-2,0 ± 7,1	0,436
LDL-c, mg/dL	Basal	187 ± 25	180 ± 22	175 ± 22	188 ± 29	0,375
	Atorva	117 ± 22	116 ± 21	113 ± 22	106 ± 26	0,507
	%	-37,2 ± 11,2	-34,9 ± 12,3	-35,3 ± 10,9	-43,5 ± 8,4	0,072
VLDL-c, mg/dL	Basal	29 ± 12	32 ± 13	27 ± 11	28 ± 10	0,635
	Atorva	24 ± 11	27 ± 11	25 ± 7	23 ± 8	0,742
	%	-15,2 ± 33,6	-11,5 ± 33,1	-3,8 ± 26,1	-14,3 ± 26,2	0,656
TG, mg/dL	Basal	147 ± 61	159 ± 66	135 ± 56	140 ± 51	0,635
	Atorva	121 ± 58	133 ± 57	123 ± 37	116 ± 42	0,742
	%	-15,2 ± 33,6	-11,5 ± 33,1	-3,8 ± 26,1	-14,3 ± 26,2	0,656
apoAI, mg/dL	Basal	136 ± 24	147 ± 36	143 ± 33	144 ± 27	0,739
	Atorva	135 ± 20	151 ± 29	147 ± 25	157 ± 29	0,088
	%	-0,1 ± 10,7	3,9 ± 12,2	14,3 ± 66,2	9,3 ± 9,8	0,618
apoB, mg/dL	Basal	149 ± 44	139 ± 26	136 ± 21	147 ± 31	0,590
	Atorva	98 ± 27	97 ± 21	94 ± 22	97 ± 16	0,927
	%	-32,7 ± 12,6	-29,2 ± 15,5	-31,2 ± 12,0	-32,8 ± 9,2	0,810
apoB/apoAI	Basal	1,10 ± 0,27	0,99 ± 0,28	1,09 ± 0,73	1,05 ± 0,27	0,874
	Atorva	0,74 ± 0,20	0,66 ± 0,16	0,65 ± 0,15	0,64 ± 0,15	0,287
	%	-32,6 ± 10,7	-30,9 ± 19,1	-33,1 ± 16,8	-38,2 ± 9,2	0,477

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Valores apresentados como média ± DP e comparados por ANOVA.

Tabela 16 - Relação entre a expressão de mRNA do *SCAP* em CMSP e a resposta a atorvastatina em pacientes do grupo HNF.

		Níveis de expressão basal de <i>SCAP</i>				p
		<0.029 (18)	0.029 - 0.054 (18)	0.055-0.079 (18)	> 0.080 (18)	
<i>SCAP</i> mRNA	Atorva	0,0322 ± 0,0341	0,0605 ± 0,0395	0,0801 ± 0,0807	0,125 ± 0,102	0,002
CT, mg/dL	Basal	270 ± 39	274 ± 27	267 ± 23	275 ± 28	0,849
	Atorva	197 ± 32	188 ± 24	199 ± 21	196 ± 26	0,587
	%	-26,6 ± 11,0	-31,4 ± 6,7	-25,0 ± 9,2	-28,8 ± 5,6	0,134
HDL-c, mg/dL	Basal	55 ± 10	61 ± 11	61 ± 18	61 ± 13	0,401
	Atorva	53 ± 10	57 ± 13	59 ± 16	58 ± 10	0,479
	%	-3,5 ± 8,8	-7,7 ± 13,6	-3,4 ± 5,5	-3,8 ± 8,2	0,469
LDL-c, mg/dL	Basal	185 ± 36	183 ± 21	179 ± 17	184 ± 23	0,914
	Atorva	118 ± 27	105 ± 20	117 ± 22	113 ± 20	0,303
	%	-35,3 ± 13,2	-42,7 ± 8,9	-34,4 ± 12,9	-38,5 ± 7,4	0,102
VLDL-c, mg/dL	Basal	29 ± 11	30 ± 11	27 ± 12	31 ± 13	0,828
	Atorva	25 ± 11	25 ± 12	24 ± 10	25 ± 6	0,968
	%	-9,7 ± 34,9	-16,9 ± 30,2	-10,5 ± 19,9	-7,6 ± 33,1	0,812
TG, mg/dL	Basal	144 ± 56	149 ± 53	136 ± 62	153 ± 65	0,828
	Atorva	124 ± 55	123 ± 59	118 ± 51	126 ± 30	0,968
	%	-9,7 ± 34,9	-16,9 ± 30,2	-10,5 ± 19,9	-7,6 ± 33,1	0,812
apoAI, mg/dL	Basal	136 ± 23	145 ± 17	144 ± 45	144 ± 27	0,763
	Atorva	131 ± 23	152 ± 23	154 ± 32	152 ± 23	0,036
	%	-2,3 ± 13,5	4,3 ± 8,6	18,7 ± 63,1	6,35 ± 11,6	0,304
apoB, mg/dL	Basal	141 ± 24	139 ± 25	138 ± 25	152 ± 47	0,558
	Atorva	96 ± 25	92 ± 22	100 ± 21	97 ± 19	0,793
	%	-32,0 ± 12,7	-33,9 ± 8,3	-27,2 ± 13,5	-33,1 ± 13,8	0,380
apoB/apoAI	Basal	1,06 ± 0,19	0,97 ± 0,20	1,13 ± 0,74	1,08 ± 0,32	0,727
	Atorva	0,74 ± 0,17	0,62 ± 0,15	0,68 ± 0,20	0,65 ± 0,13	0,164
	%	-29,7 ± 12,8	-36,4 ± 7,3	-32,2 ± 21,1	-37,0 ± 12,3	0,389

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Valores apresentados como média ± DP e comparados por ANOVA.

Tabela 17 - Relação entre a expressão de mRNA do *HMGCR* em CMSP e a resposta a atorvastatina em pacientes do grupo HNF.

		Níveis de expressão basal de <i>HMGCR</i>				p
		<0.0051 (18)	0.0051 - 0.0079 (18)	0.0080-0.0198 (18)	> 0.0199 (18)	
<i>HMGCR</i> mRNA	Atorva	0,00593 ± 0,00527	0,0134 ± 0,0106	0,0219 ± 0,0321	0,0397 ± 0,0377	0,001
TC, mg/dL	Basal	276 ± 36	263 ± 25	275 ± 31	273 ± 25	0,552
	Atorva	193 ± 33	186 ± 22	203 ± 20	197 ± 25	0,266
	%	-29,7 ± 10,1	-28,9 ± 8,6	-25,6 ± 9,3	-27,7 ± 5,7	0,504
HDL-c, mg/dL	Basal	58 ± 13	55 ± 11	61 ± 9	65 ± 18	0,142
	Atorva	55 ± 12	53 ± 8	58 ± 11	60 ± 17	0,265
	%	-3,6 ± 7,7	-3,6 ± 9,2	-4,9 ± 8,7	-6,4 ± 12,2	0,789
LDL-c, mg/dL	Basal	190 ± 33	176 ± 17	186 ± 25	178 ± 19	0,269
	Atorva	114 ± 29	108 ± 20	120 ± 20	111 ± 22	0,472
	%	-39,9 ± 12,1	-38,3 ± 11,5	-34,88 ± 12,2	-38,0 ± 8,6	0,574
VLDL-c, mg/dL	Basal	26 ± 9	32 ± 12	28 ± 13	30 ± 13	0,572
	Atorva	23 ± 8	26 ± 10	25 ± 11	25 ± 10	0,892
	%	-8,8 ± 32,2	-15,4 ± 31,0	-7,8 ± 37,2	-12,7 ± 15,9	0,867
TG, mg/dL	Basal	132 ± 43	159 ± 60	142 ± 63	148 ± 66	0,572
	Atorva	116 ± 38	128 ± 51	124 ± 57	125 ± 52	0,892
	%	-8,8 ± 32,2	-15,4 ± 31,0	-7,8 ± 37,2	-12,7 ± 15,9	0,867
apoA1, mg/dL	Basal	137 ± 25	134 ± 21	140 ± 31	158 ± 36	0,073
	Atorva	138 ± 25 ^{a,b}	133 ± 22 ^a	155 ± 17 ^{b,c}	163 ± 31 ^c	0,001
	%	1,06 ± 8,6	-0,42 ± 13,5	22,0 ± 62,3	3,9 ± 11,7	0,163
apoB, mg/dL	Basal	140 ± 23	138 ± 24	144 ± 34	149 ± 43	0,787
	Atorva	94 ± 23	92 ± 22	103 ± 19	96 ± 21	0,453
	%	-32,8 ± 11,4	-33,7 ± 10,0	-26,3 ± 15,0	-33,4 ± 11,7	0,234
apoB/apoA1	Basal	1,05 ± 0,2	1,05 ± 0,2	1,17 ± 0,73	0,97 ± 0,30	0,615
	Atorva	0,70 ± 0,19	0,70 ± 0,15	0,68 ± 0,15	0,61 ± 0,17	0,405
	%	-33,2 ± 12,5	-32,8 ± 9,7	-33,4 ± 22,1	-35,7 ± 10,4	0,936

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Valores apresentados como média ± DP e comparados por ANOVA. a,b,c Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes (teste de Tukey)

Tabela 18 - Relação entre a expressão de mRNA do *LDLR* em CMSP e a resposta a atorvastatina em pacientes do grupo HNF.

		Níveis de expressão basal de <i>LDLR</i>				p
		<0.0041 (18)	0.0041 - 0.0075 (18)	0.0075-0.0163 (18)	> 0.0169 (18)	
<i>LDLR</i> mRNA	Atorva	0,00701 ± 0,00678	0,0176 ± 0,0224	0,0182 ± 0,0136	0,0771 ± 0,178	<0,001
CT, mg/dL	Basal	266 ± 23	285 ± 42	272 ± 27	264 ± 18	0,132
	Atorva	190 ± 21	204 ± 34	197 ± 26	190 ± 18	0,283
	%	-27,9 ± 11,4	-28,2 ± 7,7	-27,5 ± 9,2	-28,2 ± 5,5	0,995
HDL-c, mg/dL	Basal	58 ± 13	62 ± 11	59 ± 17	60 ± 13	0,866
	Atorva	54 ± 11	58 ± 11	58 ± 16	56 ± 12	0,732
	%	-6,6 ± 8,2	-5,1 ± 8,9	-1,4 ± 6,5	-5,4 ± 13,0	0,384
LDL-c, mg/dL	Basal	176 ± 17	194 ± 35	184 ± 25	177 ± 13	0,089
	Atorva	109 ± 23	121 ± 28	113 ± 23	109 ± 15	0,352
	%	-37,2 ± 15,2	-37,3 ± 11,09	-38,3 ± 10,5	-38,0 ± 7,4	0,990
VLDL-c, mg/dL	Basal	30 ± 8	29 ± 15	30 ± 13	28 ± 11	0,943
	Atorva	26 ± 9	24 ± 10	26 ± 11	23 ± 9	0,748
	%	-7,1 ± 40,2	-13,0 ± 23,4	-9,1 ± 34,6	-15,6 ± 16,3	0,883
TG, mg/dL	Basal	150 ± 40	145 ± 74	148 ± 64	138 ± 53	0,943
	Atorva	129 ± 46	119 ± 50	130 ± 56	114 ± 45	0,748
	%	-7,1 ± 40,2	-13,0 ± 23,4	-9,1 ± 34,6	-15,6 ± 16,3	0,883
apoAI, mg/dL	Basal	145 ± 30	142 ± 19	141 ± 35	140 ± 35	0,956
	Atorva	142 ± 31	149 ± 21	144 ± 33	154 ± 21	0,617
	%	-1,1 ± 15,6	4,8 ± 10,3	2,5 ± 8,9	21,7 ± 64,1	0,196
apoB, mg/dL	Basal	141 ± 29	143 ± 30	138 ± 27	149 ± 40	0,781
	Atorva	92 ± 18	99 ± 26	96 ± 23	99 ± 20	0,743
	%	-33,9 ± 11,5	-30,6 ± 29,9	-29,4 ± 15,8	-32,0 ± 11,8	0,735
apoB/apoAI	Basal	1,01 ± 0,29	1,01 ± 0,20	1,03 ± 0,30	1,20 ± 0,72	0,510
	Atorva	0,67 ± 0,15	0,67 ± 0,15	0,70 ± 0,22	0,65 ± 0,14	0,864
	%	-31,9 ± 13,6	-33,6 ± 8,3	-30,4 ± 19,2	-39,3 ± 13,5	0,281

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Valores apresentados como média ± DP e comparados por ANOVA.

4.4 Relação de polimorfismos genéticos com a expressão gênica em CMSP

A distribuição de genótipos e a frequência de alelos para os polimorfismos *SREBF1a* -36delG, *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G nos grupos NL e HNF estão apresentadas na tabela 19. Devido ao pequeno número de indivíduos no grupo HF, a análise genética neste grupo não foi realizada.

Os resultados da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg avaliada pelo teste de qui-quadrado, indicam que para os polimorfismos estudados, o número de genótipos observados em ambos os grupos obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Portanto a amostragem analisada é representativa da população permitindo, de forma confiável, a comparação das frequências gênicas entre os grupos avaliados.

Tabela 19 - Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos -36delG do *SREBF1a*, G1784C do *SREBF2* e A2386G do *SCAP* nos grupos hipercolesterolemia não-familiar (HNF), e normolipidêmicos (NL)

Polimorfismo	Distribuição de genótipos			Frequência de Alelos	
-36delG <i>SREBF1a</i>	G+G+	G+G-	G-G-	G+	G-
HNF (72)	27,8% (20)	54,2% (39)	18,0% (13)	54,9%	45,1%
NL (125)	34,4% (43)	48,0% (60)	17,6% (22)	58,4%	41,6%
	$\chi^2 = 0,978$ (2 gl, p=0,613)			$\chi^2 = 0,334$ (1 gl, p=0,563)	
G1784C <i>SREBF2</i>	GG	GC	CC	C	G
HNF (72)	37,5% (27)	44,4% (32)	18,1% (13)	59,7%	40,3%
NL (125)	33,6% (42)	47,2% (59)	19,2% (24)	57,2%	42,8%
	$\chi^2 = 0,305$ (2 gl, p=0,858)			$\chi^2 = 0,146$ (1 gl, p=0,702)	
A2386G <i>SCAP</i>	AA	AG	GG	A	G
HNF (72)	19,4% (14)	54,2% (39)	26,4% (19)	46,5%	53,5%
NL (125)	18,4% (23)	51,2% (64)	30,4% (38)	46,2%	53,8%
	$\chi^2 = 0,357$ (2 gl, p= 0,836)			$\chi^2 = 0,145$ (1 gl, p=0,703)	

Nota: Equilíbrio Hardy-Weinberg: -36delG *SREBF1a*: HNF: $\chi^2 = 0,6317$ (1gl, p>0,05); NL: $\chi^2 = 0,0184$ (1gl, p>0,05); G1784C *SREBF2*: HNF: $\chi^2 = 0,4179$ (1gl, p>0,05); NL: $\chi^2 = 0,1621$ (1gl, p>0,05); A2386G *SCAP*: HNF: $\chi^2 = 0,1897$ (1gl, p>0,05); NL: $\chi^2 = 0,5650$ (1gl, p>0,05);

A expressão basal de mRNA do *SREBF1a* em CMSP foi similar entre os portadores dos genótipos do SNP *SREBF1a* -36delG em ambos os grupos NL e HNF ($p > 0,05$) (Figura 16). Também não foi observada relação entre esta variante e o perfil de expressão de mRNA após o tratamento com atorvastatina no grupo HNF. Estes resultados são sugestivos de que o SNP *SREBF1a* -36delG não está relacionado com o perfil de expressão do gene *SREBF1*.

Figura 16 - Relação do polimorfismo *SREBF1a* -36delG e a expressão de mRNA do *SREBF1a* em CMSP em indivíduos normolipidêmicos (A) e hipercolesterolêmicos não-familiar (B), antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas). Os Box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos).

A expressão basal de mRNA do *SREBF2* em CMSP foi similar entre os portadores dos genótipos *SREBF2* G1784C no grupo NL ($p > 0,05$) (Figura 17). No grupo HNF, os portadores do genótipo GG tiveram aumento 82,6 % na taxa de expressão gênica após o tratamento com atorvastatina ($p=0,033$). Este resultado é sugestivo de que o SNP *SREBF2* G1784C está relacionado com o efeito da atorvastatina sobre a expressão deste gene em CMSP.

Figura 17 - Relação do polimorfismo *SREBF2* G1784C e a expressão de mRNA do *SREBF2* em CMSP em indivíduos normolipidêmicos (A) e hipercolesterolêmicos não-familiar (B), antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas). Os Box plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos).

A expressão basal de mRNA do *SCAP* em CMSP foi similar entre os portadores dos genótipos *SCAP* A2386G nos grupos NL e HNF ($p > 0,05$) (Figura 18). Após o tratamento com atorvastatina, os portadores dos genótipos AA apresentaram valores de expressão *SCAP* diminuída quando comparados os portadores do genótipo GG ($p=0,014$) Esses resultados são sugestivos de que o genótipo AA está associado com redução de expressão do *SCAP* em resposta a atorvastatina.

Figura 18 - Relação do polimorfismo *SCAP* A2386G e a expressão de mRNA do *SCAP* em CMSP em indivíduos normolipidêmicos (A) e hipercolesterolêmicos não-familiar (B), antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas). Os Box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos).

4.5 Relação de polimorfismos genéticos com o perfil lipídico

Na tabela 20 são apresentados os dados do perfil lipídico sérico basal de normolipidêmicos separados de acordo com o genótipo do polimorfismo *SREBF1a* -36delG. Os portadores dos três genótipos tiveram perfil lipídico similar. O polimorfismo G1784C do gene *SREBF2* e o polimorfismo A2386G do gene SCAP também não estão associados com diferenças no perfil lipídico para estes pacientes (tabelas 21e 22).

Tabela 20 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas em indivíduos NL portadores de diferentes genótipos do polimorfismo *SREBF1a* -36delG.

Perfil lipídico (mg/dL)	G+G+ (43)	G+G- (60)	G-G- (22)	p
Colesterol total	175 ± 18	172 ± 18	174 ± 20	0,593
Triglicérides	83 ± 29	79 ± 27	91 ± 31	0,223
HDL-C	61 ± 16	58 ± 12	57 ± 12	0,382
LDL-C	98 ± 19	98 ± 20	99 ± 17	0,938
VLDL-C	17 ± 6	16 ± 5	18 ± 6	0,223
apoA1	149 ± 30	140 ± 25	140 ± 29	0,223
apoB	84 ± 22	86 ± 24	88 ± 28	0,828
apoB/apoA1	0,60 ± 0,24	0,64 ± 0,23	0,65 ± 0,21	0,628
LDL-C/apoB	1,21 ± 0,28	1,17 ± 0,25	1,24 ± 0,14	0,590
AIP	0,12 ± 0,22	0,12 ± 0,20	0,19 ± 0,21	0,322

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoA1: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA.

Tabela 21 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas em indivíduos NL portadores de diferentes genótipos do polimorfismo *SREBF2* G1784C.

Perfil lipídico (mg/dL)	GG (42)	GC (59)	CC (29)	p
Colesterol total	175 ± 18	173 ± 19	172 ± 17	0,742
Triglicérides	78 ± 28	87 ± 29	80 ± 28	0,258
HDL-C	60 ± 13	58 ± 14	58 ± 12	0,672
LDL-C	99 ± 17	97 ± 21	98 ± 17	0,848
VLDL-C	16 ± 6	17 ± 6	16 ± 6	0,258
apoAI	143 ± 31	143 ± 28	146 ± 20	0,921
apoB	84 ± 20	87 ± 27	85 ± 21	0,811
apoB/apoAI	0,62 ± 0,22	0,61 ± 0,25	0,60 ± 0,19	0,762
LDL-C/apoB	1,23 ± 0,29	1,17 ± 0,31	1,19 ± 0,25	0,636
AIP	0,09 ± 0,22	0,16 ± 0,25	0,13 ± 0,19	0,241

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoAI: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA.

Tabela 22 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas em indivíduos NL portadores de diferentes genótipos do polimorfismo *SCAP* A2386G.

Perfil lipídico (mg/dL)	AA (23)	AG (64)	GG (38)	p
Colesterol total	173 ± 18	174 ± 18	172 ± 19	0,755
Triglicérides	83 ± 27	83 ± 29	81 ± 29	0,925
HDL-C	57 ± 13	59 ± 14	61 ± 13	0,433
LDL-C	100 ± 17	99 ± 20	95 ± 19	0,456
VLDL-C	17 ± 5	17 ± 6	16 ± 6	0,925
apoAI	136 ± 19	142 ± 31	150 ± 25	0,160
apoB	91 ± 24	85 ± 22	84 ± 26	0,533
apoB/apoAI	0,68 ± 0,19	0,64 ± 0,24	0,59 ± 0,23	0,310
LDL-C/apoB	1,14 ± 0,27	1,20 ± 0,27	1,20 ± 0,34	0,688
AIP	0,16 ± 0,20	0,14 ± 0,20	0,10 ± 0,22	0,603

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoAI: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA.

Os perfis lipídicos séricos do grupo HNF antes e após o tratamento com atorvastatina de acordo com os genótipos do polimorfismo *SREBF1a* -36delG, *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G são apresentados nas tabelas 23, 24 e 25, respectivamente. Não houve diferença de perfil lipídico antes ou após o tratamento com atorvastatina entre os pacientes HNF em relação ao *SREBF1a* -36delG (Tabela 23).

Para o SNP *SREBF2* G1784C, as concentrações séricas de colesterol total e LDL-C foram significativamente maiores nos portadores do genótipo GG, após o tratamento com atorvastatina (Tabela 24). Apesar de não haver diferença significativa na porcentagem de redução, este resultado indica que os portadores do alelo G têm menor redução nas concentrações destes parâmetros após o tratamento. Os portadores do genótipo CC, tiveram o maior índice basal de LDL-C/apoB (que determina o tamanho da partícula de LDL), e maiores reduções deste índice após o tratamento com atorvastatina.

Em relação ao polimorfismo *SCAP* A2386G, os portadores do alelo GG apresentaram concentrações séricas maiores de apoB e menores índices LDL-C/apoB antes do tratamento quando comparados com os portadores dos outros genótipos (Tabela 25).

Tabela 23 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas no período basal e após tratamento com atorvastatina, em pacientes HNF, com diferentes genótipos do polimorfismo *SREBF1a* -36delG.

Perfil lipídico (mg/dL)		G+G+ (20)	G+G- (39)	G-G- (13)	p
Colesterol total	Basal	273 ± 39	267 ± 22	283 ± 31	0,260
	Atorvastatina	199 ± 33	191 ± 22	200 ± 22	0,402
	%	-26,7 ± 9,9	-28,2 ± 8,5	-28,9 ± 6,6	0,740
Triglicérides	Basal	139 ± 63	145 ± 58	156 ± 54	0,716
	Atorvastatina	118 ± 54	119 ± 41	143 ± 762	0,282
	%	-10,0 ± 34,3	-13,9 ± 23,4	-5,0 ± 39	0,639
HDL-C	Basal	57 ± 13	61 ± 15	61 ± 5	0,580
	Atorvastatina	54 ± 14	58 ± 13	58 ± 8	0,546
	%	-5,2 ± 11,0	-3,8 ± 7,8	-6,1 ± 12	0,721
LDL-C	Basal	187 ± 32	178 ± 19	190 ± 27	0,194
	Atorvastatina	120 ± 27	110 ± 20	113 ± 24	0,306
	%	-35,7 ± 12,0	-37,9 ± 11,1	-40,3 ± 9,9	0,504
VLDL-C	Basal	28 ± 13	29 ± 12	31 ± 11	0,716
	Atorvastatina	24 ± 11	24 ± 8	29 ± 12	0,282
	%	-10,0 ± 34,3	-13,9 ± 23,4	-5,0 ± 39	0,639
apoAI	Basal	135 ± 26	146 ± 35	145 ± 15	0,477
	Atorvastatina	142 ± 26	150 ± 33	155 ± 16	0,417
	%	5,7 ± 11,3	7,9 ± 44,3	7,6 ± 12,4	0,985
apoB	Basal	149 ± 36	135 ± 33	147 ± 24	0,440
	Atorvastatina	98 ± 26	97 ± 26	103 ± 22	0,353
	%	-34 ± 11	-23 ± 37	-28,8 ± 9,8	0,526
apoB/apoAI	Basal	1,12 ± 0,26	1,02 ± 0,54	1,01 ± 0,20	0,719
	Atorvastatina	0,69 ± 0,15	0,67 ± 0,18	0,67 ± 0,17	0,770
	%	-36,9 ± 11,5	-26,4 ± 30	-33,5 ± 9,4	0,497
LDL-c/apoB	Basal	1,29 ± 0,24	1,37 ± 0,29	1,33 ± 0,23	0,564
	Atorvastatina	1,26 ± 0,29	1,17 ± 0,21	1,11 ± 1,17	0,155
	%	-1,2 ± 17,1	-11,5 ± 23	-16,1 ± 8,3	0,090
AIP	Basal	0,35 ± 0,27	0,36 ± 0,24	0,38 ± 0,15	0,921
	Atorvastatina	0,31 ± 0,29	0,30 ± 0,22	0,37 ± 0,21	0,666

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoAI: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA

Tabela 24 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas no período basal e após tratamento com atorvastatina, em pacientes HNF, com diferentes genótipos do polimorfismo *SREBF2* G1784C.

Perfil lipídico (mg/dL)		GG (27)	CG (32)	CC (13)	p
Colesterol total	Basal	280 ± 36	265 ± 24	270 ± 23	0,168
	Atorvastatina	208 ± 27 ^b	188 ± 23 ^a	186 ± 19 ^a	0,004
	%	-25,6 ± 7,1	-28,8 ± 9,0	-30,8 ± 9,6	0,145
Triglicérides	Basal	152 ± 65	148 ± 57	124 ± 41	0,337
	Atorvastatina	139 ± 60	117 ± 41	105 ± 35	0,083
	%	-5,5 ± 33,1	-14,5 ± 30,4	-14,9 ± 18,1	0,450
HDL-C	Basal	59 ± 15	59 ± 12	64 ± 13	0,444
	Atorvastatina	57 ± 14	54 ± 11	61 ± 11	0,297
	%	-2,7 ± 8,8	-6,5 ± 9,6	-3,9 ± 8,1	0,298
LDL-C	Basal	190 ± 31	177 ± 18	182 ± 21	0,148
	Atorvastatina	122 ± 24 ^b	109 ± 20 ^a	104 ± 20 ^a	0,025
	%	-35,5 ± 8,8	-38,2 ± 10,9	-42,2 ± 13,1	0,202
VLDL-C	Basal	31 ± 13	30 ± 11	25 ± 8	0,337
	Atorvastatina	28 ± 12	23 ± 8	21 ± 7	0,083
	%	-5,5 ± 33,1	-14,5 ± 30,4	-14,9 ± 18,1	0,450
apoAI	Basal	148 ± 28	138 ± 32	143 ± 25	0,419
	Atorvastatina	148 ± 23	146 ± 31	150 ± 25	0,887
	%	0,66 ± 9,01	12,1 ± 48,4	6,37 ± 13,3	0,436
apoB	Basal	142 ± 27	137 ± 37	132 ± 20	0,392
	Atorvastatina	100 ± 23	96 ± 20	88 ± 21	0,291
	%	-28,6 ± 13,7	-33,3 ± 12,1	-33,4 ± 8,3	0,310
apoB/apoAI	Basal	0,99 ± 0,24	1,16 ± 0,56	0,95 ± 0,21	0,201
	Atorvastatina	0,69 ± 0,16	0,68 ± 0,18	0,60 ± 0,15	0,288
	%	-28,7 ± 15,6	-36,9 ± 14,2	-37,0 ± 7,6	0,062
LDL-c/apoB	Basal	1,36 ± 0,22 ^b	1,24 ± 0,20 ^b	1,59 ± 0,39 ^a	0,003
	Atorvastatina	1,24 ± 0,24	1,16 ± 0,18	1,10 ± 0,30	0,162
	%	-7,8 ± 15,7 ^b	-5,33 ± 18,9 ^b	-24,0 ± 25,0 ^a	0,013
AIP	Basal	0,38 ± 0,27	0,38 ± 0,22	0,27 ± 0,19	0,336
	Atorvastatina	0,35 ± 0,29	0,32 ± 0,19	0,21 ± 0,23	0,229

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoAI: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. a,b Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes

Tabela 25 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas no período basal e após tratamento com atorvastatina, em pacientes HNF, com diferentes genótipos do polimorfismo *SCAP* A2386G.

Perfil lipídico (mg/dL)		AA (14)	AG (39)	GG (19)	p
Colesterol total	Basal	268 ± 27	274 ± 32	271 ± 26	0,811
	Atorvastatina	188 ± 24	197 ± 28	196 ± 22	0,510
	%	-29,7 ± 7,1	-27,7 ± 8,5	-27,1 ± 9,8	0,673
Triglicérides	Basal	161 ± 52	136 ± 61	153 ± 55	0,326
	Atorvastatina	128 ± 40	118 ± 51	130 ± 51	0,614
	%	-17,9 ± 17,6	-9,2 ± 31,5	-10,4 ± 33,3	0,637
HDL-C	Basal	55 ± 9 ^a	63 ± 14 ^b	56 ± 12 ^a	0,034
	Atorvastatina	52 ± 6 ^a	60 ± 14 ^b	53 ± 11 ^a	0,037
	%	-5,7 ± 7,4	-5,0 ± 10,9	-3,1 ± 7,6	0,708
LDL-C	Basal	180 ± 27	183 ± 27	183 ± 19	0,943
	Atorvastatina	111 ± 22	113 ± 24	116 ± 22	0,782
	%	-48,4 ± 9,9	-38,2 ± 10,9	-36,2 ± 12,9	0,795
VLDL-C	Basal	32 ± 10	27 ± 12	31 ± 11	0,326
	Atorvastatina	26 ± 8	24 ± 10	26 ± 10	0,614
	%	-17,9 ± 17,6	-9,2 ± 31,5	-10,4 ± 33,3	0,637
apoA1	Basal	135 ± 25	147 ± 34	140 ± 25	0,463
	Atorvastatina	134 ± 22	154 ± 32	148 ± 22	0,095
	%	-0,17 ± 9,7	10,3 ± 43,9	6,4 ± 13	0,657
apoB	Basal	134 ± 20 ^a	134 ± 29 ^a	160 ± 41 ^b	0,020
	Atorvastatina	92 ± 18	98 ± 29	104 ± 18	0,195
	%	-31,5 ± 8,6	-23,1 ± 36,4	-32,6 ± 13,4	0,891
apoB/apoA1	Basal	1,03 ± 0,25	1,02 ± 0,53	1,15 ± 0,27	0,531
	Atorvastatina	0,71 ± 0,20	0,64 ± 0,17	0,71 ± 0,13	0,181
	%	-30,9 ± 10,6	-33,5 ± 16,4	-36,3 ± 12,7	0,569
LDL-c/apoB	Basal	1,36 ± 0,24 ^a	1,40 ± 0,27 ^a	1,20 ± 0,23 ^b	0,018
	Atorvastatina	1,22 ± 0,21	1,19 ± 0,25	1,13 ± 0,22	0,536
	%	-9,23 ± 16,9	-12,9 ± 20,0	-3,3 ± 22,2	0,232
AIP	Basal	0,45 ± 0,18	0,30 ± 0,24	0,42 ± 0,22	0,046
	Atorvastatina	0,38 ± 0,17	0,26 ± 0,25	0,36 ± 0,23	0,147

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. 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; apoA1: apolipoproteína A1; apoB: apolipoproteína B; AIP: atherogenic index plasma. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. a,b Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes

5. DISCUSSÃO

Não foi possível detectar alterações no gene *LDLR* em todos os pacientes HF. O diagnóstico da hipercolesterolemia familiar é feito utilizando alguns critérios, como concentrações de colesterol total maiores de 300 mg/dL ou concentrações de LDL-C maiores de 200 mg/dL e presença de xantomas tendinosos. Outros critérios que sugerem, mas não são definitivos para o diagnóstico são histórico familiar de infarto agudo do miocárdio antes dos 60 anos em parentes de primeiro grau e histórico de concentrações de colesterol total maiores de 300 mg/dL em parentes de primeiro ou segundo grau (BHATNAGAR; SORAN; DURRINGTON 2008).

Nos pacientes com HF onde não foram encontradas alterações no gene *LDLR* pode-se observar critérios clínicos e laboratoriais compatíveis com a confirmação do diagnóstico de hipercolesterolemia familiar. Recentemente, foi descrito que alterações no gene *PCSK9* também são importantes fatores para o desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar, porém não foram realizados estes testes para a confirmação do diagnóstico nos pacientes do presente estudo.

Neste estudo, o tratamento com atorvastatina reduziu o colesterol total sérico em 28% (2,3% - 43,4%) e LDL-C em 38% (6,4% - 61,7%), nos pacientes do grupo HNF. Esses resultados foram semelhantes aos de outros estudos que mostraram redução de colesterol total sérico pela atorvastatina em 28-32% e de LDL-C em 42-44% (YOSHITOMI *et al.*, 2006; OZAKI *et al* 2006).

O tratamento com sinvastatina nos pacientes com HF reduziu o colesterol total sérico em 29% (15%- 46%) e LDL-C em 39% (25%- 67%). Estes resultados foram semelhantes ao estudo de De Jongh *et al* (2002) que descreveram um estudo em que crianças com HF respondiam bem ao tratamento com sinvastatina (redução de 30,1% no colesterol total e de 39,8% no LDL-C), sem evidências de efeitos adversos, principalmente durante a fase de crescimento.

A associação da sinvastatina com ezetimiba reduziu o colesterol total sérico em 40% (18%- 59%) e o LDL-C em 53% (23%- 72%). Esses resultados são similares aos de Rodney *et al.* (2006) que estudaram indivíduos com hipercolesterolemia primária e a associação de sinvastatina a associação sinvastatina (20mg/dia) e ezetimiba (10mg/dia) resultou em redução de 46,5% de LDL-C.

Em pacientes com infarto agudo do miocárdio a sinvastatina isolada, administrada a 40mg/dia durante uma semana, reduziu as concentrações de LDL-C em 25% e quando 10mg/dia de ezetimiba foram adicionados a terapia com sinvastatina, as concentrações de LDL-C foram reduzidas em 51%. (CHENOT *et al.* 2007).

No presente trabalho, a taxa de expressão de mRNA basal do *NPC1L1* em CMSP foi maior nos indivíduos HF do que nos normolipidêmicos. O *NPC1L1* é expresso principalmente nos enterócitos, mas também é expresso no fígado, nas membranas dos canalículos biliares (YU, 2008). Sua função é captar o colesterol do canalículo de volta ao fígado aumentando o conteúdo de colesterol hepático. É possível que a disfunção do receptor de LDL nos pacientes com hipercolesterolemia familiar, causando uma diminuição de colesterol intracelular,

aumente a expressão de *NPC1L1* como um mecanismo para aumentar o conteúdo intracelular de colesterol através de sua reabsorção do canalículo biliar.

Neste estudo não foram observadas diferenças na taxa de expressão de mRNA do *NPC1L1* após o tratamento com sinvastatina. Esse resultado é semelhante ao trabalho de Lally *et al.* (2006) que estudou enterócitos de indivíduos diabéticos tratados com diferentes vastatinas e a expressão do mRNA do *NPC1L1* diminuiu em 40%, mas não foi significativa.

Gouni Berthold *et al.* (2007) foram os primeiros a descrever a expressão de *NPC1L1* em células mononucleares do sangue periférico. Diferentemente deste estudo, eles encontraram uma pequena, porém significativa redução da expressão do mRNA do *NPC1L1* após o tratamento com sinvastatina (40mg/dia/2 semanas). Esses dados podem ser contraditórios pelo fato do estudo de Gouni-Berthold ter encontrado um valor de *p* muito próximo de 0,05 ($p=0,0495$) e pelo tempo de tratamento ser inferior ao do presente estudo.

A terapia combinada de sinvastatina e ezetimiba também não afetou a taxa de transcrição do gene *NPC1L1*. Assim como o presente trabalho, a ezetimiba em monoterapia ou combinada com sinvastatina não afetou a taxa de expressão de *NPC1L1* em CMSP (GOUNI-BERTHOLD *et al.* 2007).

Neste trabalho, a expressão dos genes *HMGCR* e *LDLR* no período basal foi maior em indivíduos HF que nos HNF e NL. Isso pode ser explicado pela deficiência no *LDLR* característica dos indivíduos HF e a conseqüente deficiência na captação de colesterol da LDL-C pela célula. Quando o conteúdo de colesterol no interior da célula está baixo, a ação do complexo SREBP /SCAP

aumenta a taxa de transcrição do gene *HMGCR* e do gene *LDLR*. Como o LDLR não funciona adequadamente e, portanto não pode captar colesterol para dentro da célula, a célula continua ativando a transcrição destes genes para tentar aumentar seu conteúdo de colesterol.

A atorvastatina não exerceu efeito na expressão dos genes *HMGCR* e *LDLR* nos indivíduos com hipercolesterolemia não familiar. Ness, Zhao e Lopez (1996) demonstraram que a lovastatina, pravastatina, fluvastatina e atorvastatina aumentaram o mRNA do *LDLR* hepático, mas não os níveis de proteína em um estudo com ratos. Além disso, eles demonstraram um aumento da degradação protéica do LDLR com as vastatinas, sugerindo que as vastatinas podem aumentar a taxa de LDL-C por aumentar a taxa de ciclagem do receptor.

A sinvastatina em monoterapia não exerceu nenhum efeito na expressão dos genes *HMGCR* e *LDLR* nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar. Similarmente, Medina *et al.* (2008) não encontraram diferenças entre a expressão de mRNA do gene *HMGCR* e a resposta a sinvastatina em linfócitos humanos, porém demonstraram que o aumento da taxa de mRNA do transcrito alternativo (exon 13 ausente), esteve fortemente correlacionado com menores taxas de redução (6-15%) de colesterol total, LDL-C, apoB e triglicérides.

De acordo com Gouni Berthold *et al.* (2007), a sinvastatina induziu o aumento da expressão do mRNA dos genes *HMGCR* e *LDLR* em CMSP de homens saudáveis. Essas diferenças podem ser devidas ao estado metabólico dos pacientes com hipercolesterolemia familiar que neste estudo possuem uma maior taxa de expressão basal destes genes.

A associação de sinvastatina e ezetimiba tampouco exerceu efeito na expressão dos genes *HMGCR* e *LDLR* nos indivíduos do grupo HF. Ainda de acordo com Gouni Berthold *et al.* (2007), a adição de ezetimiba ao tratamento com sinvastatina em homens saudáveis aumentou a taxa de transcrição do gene *LDLR* mas não do gene *HMGCR*. Gagne, Gaudet e Bruckert (2002) demonstraram que a ezetimiba é eficiente em pacientes com hipercolesterolemia familiar, sugerindo o mecanismo de ação independente do LDLR. Repa *et al.* (2005) sugeriram que a ezetimiba diminui as concentrações de LDL-C devido a uma menor taxa de produção do LDL-C através da menor entrega do colesterol ao fígado pelos quilomícrons.

Apesar das diferenças encontradas na expressão basal dos genes *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* entre os grupos HF, HNF e NL, a expressão basal dos genes *SREBF1*, *SREBF2* e *SCAP* foi similar entre os diferentes grupos, indicando que o estado metabólico não influencia a transcrição desses genes. Por outro lado, em células de cultura humana, a adição de steróis ao meio suprimiu a proteína SREBP1, indicando que a transcrição é também controlada por fatores metabólicos (SHIMOMURA *et al.*, 1997).

Neste estudo, o tratamento com hipolipemiantes não modificou a taxa de expressão do mRNA dos genes *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* em CMSP. Entretanto, Tamehiro *et al.* (2007) trataram células de hepatoma humano com a combinação de pravastatina e colestiramina e verificaram um aumento da taxa de transcrição do mRNA do *SREBF2*. Em outro modelo, Bennett *et al.* (2008) estudaram ratos tratados com ezetimiba e lovastatina e encontraram que o tratamento diminuiu a expressão de *SREBF1* e aumentou a expressão de

SREBF2. Por outro lado, Telford *et al.* (2007) observaram que a ezetimiba aumenta a expressão de SREBP2 em porcos. É possível que os diferentes modelos estudados e a falta de estudos em CMSP para a expressão destes genes em resposta a hipolipemiantes causem esta divergência de resultados.

A correlação positiva encontrada na variação da expressão do mRNA após o tratamento com atorvastatina entre os genes em células mononucleares sugere que são regulados coordenadamente pela atorvastatina. Essa correlação foi observada entre os genes *SREBF1a* e *SREBF2*, *SCAP* e *SREBF1a*, *SCAP* e *SREBF2*, *LDLR* e *SREBF1a*, *LDLR* e *SREBF2* *HMGCR* e *LDLR*. Similarmente, Skarits *et al.* (2003) quantificou o mRNA de *SREBF1a* em CMSP em indivíduos normolipidêmicos e mostrou que foi positivamente correlacionado com a transcrição de outros genes relacionados com a homeostase intracelular do colesterol. Apesar de o estado metabólico estudado seja diferente é possível que haja uma ação regulatória concomitante pela atorvastatina.

Um padrão variável da transcrição dos genes *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP*, *HMGCR* e *LDLR* em resposta a atorvastatina foi encontrado em CMSP. O padrão diferencial pode ser resultante da variação de colesterol intracelular já que o colesterol bloqueia o transporte do complexo SREBP/SCAP do RE ao complexo de Golgi (BROWN *et al.* 2002). Esse mecanismo pode explicar o aumento da expressão de mRNA dos genes após o tratamento com atorvastatina. Entretanto o mecanismo pelo qual a atorvastatina causa uma diminuição da expressão gênica ainda precisa ser elucidado.

Foi observado que indivíduos com maior expressão basal de *HMGCR* apresentaram maiores concentrações séricas de apoAI após o tratamento com

atorvastatina ($p=0,001$). Nenhum trabalho associou a expressão de HMGCR com as concentrações de apoAI. O resultado pode ter sido ao acaso, pois tampouco foram observadas diferenças na variação (em %) das concentrações séricas de apoAI em relação aos diferentes perfis de expressão do gene HMGCR.

Os indivíduos HNF com expressão do gene SCAP aumentada pela atorvastatina apresentaram maior redução do índice apoB/apoAI quando comparada aos que tiveram a expressão diminuída com o tratamento. O aumento da expressão do gene SCAP dentro da célula favorece a transcrição de receptores de LDL aumentando a captação do colesterol das LDL circulantes. Assim sendo, a relação apoB/apoAI, como um bom marcador de fator de risco para DAC, diminuiria com essa diminuição do LDL-C circulante.

A frequência relativa do alelo G- do polimorfismo *SREBF1a* -36delG, no nosso estudo, foi similar entre os indivíduos dos grupos HNF (45,1%) e NL (41,6%, $p > 0,05$). Em um grupo com desenvolvimento de aterosclerose a frequência do alelo G- foi de 58% (VEDIE *et al.* 2001). Rios *et al* (2003) estudaram pacientes com doença arterial coronariana e a frequência do alelo G- nessas indivíduos foi de 53%, similar ao grupo de indivíduos saudáveis (57%). Em outro trabalho, avaliando pacientes obesos a frequência foi de 58%, porém no mesmo estudo a frequência do alelo G- foi de 63% para os indivíduos não obesos (EBERLE *et al.* 2004). Em um estudo brasileiro, a frequência do alelo G- em um grupo de hipercolesterolêmicos foi de 51% (FIEGENBAUM *et al.*, 2005a). Os resultados aqui encontrados sugerem que a frequência relativa do alelo G- do polimorfismo -36delG do *SREBF1a* no nosso trabalho são similares as encontradas em outros estudos ($p > 0,05$).

A frequência relativa do alelo G do polimorfismo *SREBF2* G1784C no presente trabalho foi similar entre os grupos avaliados (59,7% nos indivíduos hipercolesterolêmicos não familiar (HNF), 57,2% nos indivíduos normolipidêmicos (NL)). Miserez et al (2002) foram quem primeiro descreveu este polimorfismo e encontrou uma frequência do genótipo CC de 9,5% em pacientes com hipercolesterolemia familiar, e foi maior do que em pacientes normolipidêmicos. Friedlander *et al.* (2007) encontraram uma frequência do alelo G de 66% em homens e 60% mulheres com infarto do miocárdio, frequências semelhantes às encontradas no presente estudo.

Em relação ao polimorfismo *SCAP* A2386G, a frequência alélica do alelo G no nosso estudo foi de 53,5% nos indivíduos hipercolesterolêmicos não familiar (HNF), e de 53,8 % nos indivíduos normolipidêmicos. Esses resultados são similares aos estudos de Iwaki et al (1999), que descreveu pela primeira vez este polimorfismo (43%), Fiegenbaum *et al* (2005a) (48%), Durst *et al* (2006) (53%) e Friedlander *et al* (2007) (43%).

O polimorfismo *SREBF1a* -36delG não foi associado a diferenças nas concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas nos pacientes normolipidêmicos e tampouco houve diferença na variação de lipídeos e lipoproteínas após o tratamento com atorvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos. Resultados similares foram observados em outros estudos (RIOS *et al.*, 2003; FIEGENBAUM *et al.*, 2005a). Porém, Salek *et al.* (2002) encontraram uma forte interação entre o tratamento com a fluvastatina e esse polimorfismo, onde pacientes portadores do genótipo G+G+ aumentaram mais as concentrações de apoAI após o tratamento do que os portadores dos

outros genótipos. Por outro lado, esse SNP foi relacionado com maiores concentrações séricas de colesterol total e LDL-C em homens com alto risco para doença cardiovascular (VEDIE *et al.*, 2001).

O polimorfismo *SREBF2* G1784C não foi associado com diferenças nas concentrações de lípides em pacientes normolipidêmicos. Entretanto nos pacientes tratados com atorvastatina, os portadores do genótipo GG apresentaram maiores concentrações de CT e LDL-C após o tratamento, quando comparados aos outros genótipos. Apesar de a porcentagem de redução não ser estatisticamente significativa, os dados sugerem que este genótipo pode estar associado com menores reduções destes parâmetros após o tratamento. Além disso, para este mesmo grupo, os índices de LDL-C/apoB basais dos portadores do genótipo CC foram maiores quando comparados aos portadores dos outros genótipos e a porcentagem de redução após o tratamento também foi maior, indicando que a presença deste genótipo pode estar contribuindo para a redução deste índice aterogênico após o tratamento com atorvastatina. Fiegenbaum *et al* (2005) estudaram a influência deste polimorfismo em resposta ao tratamento com sinvastatina, mas nenhuma alteração foi encontrada.

Quanto ao polimorfismo do *SCAP*, não foram observadas diferenças nas concentrações de lípides em pacientes normolipidêmicos. Entre os pacientes com HNF tratados com atorvastatina, observou-se que antes do tratamento as concentrações de apoB foram maiores nos indivíduos do genótipo GG, e o índice de LDL-C/apoB maior no genótipo AA. Fiegenbaum *et al* (2005a) identificou que os portadores do alelo G do polimorfismo A2386G *SCAP* tiveram maior redução de colesterol total e triglicérides após o tratamento com sinvastatina em

pacientes hipercolesterolêmicos. Entretanto em um estudo com indivíduos ateroscleróticos tratados com fluvastatina, não foi encontrada relação do polimorfismo *SCAP* com a redução do perfil lipídico e da progressão da doença aterosclerótica (SALEK *et al.*, 2002).

Também foi observado para este polimorfismo, que o genótipo GC esteve associado a maiores concentrações de HDL-C antes e após o tratamento com atorvastatina e menor índice AIP na fase basal do tratamento. Esse resultado pode ter sido ao acaso, uma vez que a diferença encontrada não esteve relacionada a nenhum dos alelos e sim com o heterozigoto.

Este estudo avaliou pela primeira vez a relação entre polimorfismos dos genes *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* e a expressão gênica em células mononucleares. Pelos dados obtidos, o SNP -36delG do *SREBF1a* não está associado com diferenças na taxa de transcrição gênica induzidas pela atorvastatina. Isto pode ser explicado porque o polimorfismo -36delG não está localizado na pequena região de ligação de um dos principais fatores de transcrição do gene *SREBP1a* o Sp1 (ZHANG *et al.*, 2005).

Com relação ao polimorfismo *SREBF2* G1784C, os portadores do genótipo GG apresentaram ligeiro aumento da expressão após o tratamento com atorvastatina, diferentemente dos outros genótipos. Nenhum outro estudo avaliou a associação entre este polimorfismo e a expressão deste gene, mas Friedlander (2007) sugeriu em seu estudo que os portadores do genótipo CC apresentavam maior risco para desenvolver infarto agudo do miocárdio. Com estes dados, provavelmente a presença do genótipo GG aumenta a expressão do gene *SREBF2* após a terapia, com isso aumentando a quantidade de

receptores de LDLR nas membranas celulares diminuindo as concentrações séricas de LDL. Estes dados em conjunto sugerem que a presença do alelo G seria um efeito protetor para o aparecimento do infarto agudo do miocárdio e a presença do alelo C um efeito pro - aterogênico.

Em relação ao polimorfismo *SCAP* A2386G, observou-se que os indivíduos com genótipo AA apresentaram menores taxas de expressão de mRNA do gene *SCAP* ($p=0,014$). Esse dado sugere que o alelo A pode estar envolvido na variação da expressão gênica modulada pela resposta a atorvastatina. A mudança do alelo A para o alelo G causa a modificação do aminoácido Isoleucina (Ile) para o aminoácido Valina (Val). Interessantemente, essas isoformas diferem exatamente na região de aminoácidos onde a proteína *SCAP* interage com os SREBPs e inicia a clivagem dessas proteínas (DURST *et al.*, 2006). Dessa forma, o aminoácido Ile pode estar associado a menores níveis de expressão gênica do *SCAP* quando comparado ao aminoácido Val.

Estes resultados são sugestivos que os polimorfismos estudados estão pouco envolvidos com a determinação da resposta farmacológica a atorvastatina. É notável que SREBP1, SREBP2 e *SCAP* são proteínas chave na modulação da expressão de *HMGCR* e *LDLR* nas células, portanto polimorfismos que influenciam a expressão podem afetar a farmacodinâmica e conseqüentemente os efeitos farmacológicos das vastatinas sem determinar uma variação significativa nos lípides séricos. Adicionalmente, diferenças na farmacocinética das vastatinas e o estado metabólico do paciente podem também contribuir para a variação da resposta terapêutica entre os portadores dos diferentes genótipos desses polimorfismos.

6. CONCLUSÕES

A taxa de expressão basal do mRNA dos genes *HMGCR*, *LDLR* e *NPC1L1* em células mononucleares do sangue periférico é maior nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar do que nos indivíduos não-familiar e normolipidêmicos.

A taxa de expressão basal de mRNA dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2* e *SCAP* em células mononucleares de indivíduos com hipercolesterolemia não-familiar é muito variável. O efeito da atorvastatina sobre a expressão destes genes parece depender da expressão basal.

A sinvastatina isolada ou combinada com ezetimiba não afetou a taxa de transcrição dos genes *HMGCR*, *LDLR*, *SREBF1a*, *SREBF2*, *SCAP* e *NPC1L1* em células mononucleares do sangue periférico

Os polimorfismos *SREBF1a* -36delG, *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G parecem não estar associados com diferenças na expressão de mRNA em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.

O perfil de expressão de mRNA é influenciado pelos polimorfismos *SREBF2* G1784C e *SCAP* A2386G após o tratamento com atorvastatina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADACHI, H.; TSUJIMOTO, M. Endothelial scavenger receptors. **Prog Lipid Res.**, v.45, p.379-404, 2006.

ALONSO, R.; MATA, N.; MATA, P. Benefits and risks assessment of simvastatin in familial hypercholesterolemia. **Expert Opin Drug Saf**, v. 4(2), p. 171-181, 2005

ALREFAI, W.A; ANNABA, F.; SARWAR, F.; DWIVEDI, A.; SAKSENA, S.; SINGLA, A.; DUDEJA, P.K.; GILL, R. Modulation of human Niemann- Pick C1 like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein-2. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.292, p.G369–G376, 2007.

ALSHEIKH- ALI, A.A.; MADDUKURI, P.V.; HAN, H.; KARAS, R.R. Effect of the magnitude of lipid lowering on risk of elevated liver enzymes, rhabdomyolysis, and cancer: insights from large randomized statin trials. **J Am Coll Cardiol.**, v.50, n.5, p.409-18, 2007.

ALTMANN S.C., DAVIS H.R., ZHU L.J., YAO X., HOOS L.M., TETZLOFF G., IYER S.P.N., MAGUIRE M., GOLOVKO A., ZEN M., WANG L., MURGOLO N., GRAZIANO M.P. Nieman-Pick C1 Like 1 Protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, v.303, p.1201-1204, 2004.

ARAZI, S.S.; GENVIGIR, F.D.V.; WILLRICH, M.A.V.; HIRATA, M.H./ DOREA, E.L.; BERNIK, M.; HIRATA, R.D.C. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. **Clinica Chimica Acta**, v.393, p.119–124, 2008.

BALLANTYNE, C.; HOURI, J.; NOTARBARTOLO, A.; MELANI, L.; LIPKA, L.J.; SURESH, R.; SUN, S.; LEBEAUT, A.P.; SAGER, PT.; VELTRI, E.P.; EZETIMIBE STUDY GROUP. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. **Circulation**, 19, e9043-e9044, 2003

BENNETT, M.K.; SEO, Y.K.; DATTA, S.; SHIN, D.J.; OSBORNE, T.F. Selective binding of sterol regulatory element-binding protein isoforms and co-regulatory proteins to promoters for lipid metabolic genes in liver. **J Biol Chem.**, v.283(23):, p.15628-37, 2008

BERCOVICH, D.; FRIEDLANDER, Y.; KOREM, S.; HOUMINER, S.; HOFFMAN, A; KLEINBERG, L.; CHOCHAT, C.; LEITERSDORF, E.; MEINER, V. The association of common SNPs and haplotypes in the CETP and MDR1 genes with lipids response to fluvastatin in familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.185, p.97-107, 2006

BERGMEYER H.U., SCHEIBE P., WAHLEFELD A.W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clin Chem.** v.24(1) p.58-73. 1978

* De acordo com as “Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso”. Vânia M.B. de Oliveira Funaro, et.al., São Paulo, SIBi-USP, 2004.

BERTOLINI, S.; CASSANELI, R.; GARUTI, M.; GHISELLINI, M.; ROLLERI, S.; MASTURZO, P.; CALANDRA, S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.19, p.408-418, 1999.

BHATNAGAR, D.; SORAN, H.; DURRINGTON, P.N. Hypercholesterolaemia and its management. **BMJ**, v.337, p.a993, 2008.

BOGMAN, K.; PEYER, A.K.; TÖRÖK, M.; KÜSTERS, E.; DREWE, J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. **Br J Pharmacol**, v.132, p.1183-92, 2001.

BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**. v. 232 n.4746, p. 34-47. 1986.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v.89, n.3, p.331-40, 1997

BROWN, A.J.; SUN, L.; FERAMISCO, J.D.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. **Mol Cell**, v.10(2), p.237-45, 2002.

BRUCKERT, E.; GIRAL, P.; TELLIER, P. Perspectives in cholesterol-lowering therapy: the role of ezetimibe, a new selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. **Circulation**, v.107, n.25, p.3124-8, 2003.

BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v.109, p. 365–379, 2005

CASTELLI W.P. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham study. **Am. J. Med.** v.76 n. suppl. 2A, p-4-12, 1984.

CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; NAKANDAKARE, E.R.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clin Chim Acta**. v.302 (1-2), p.189-203, 2000.

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, p.1260-7, 2004

CHASMAN, D.L.; POSADA, D.; SUBRAHMANYAN, L.; COOK, N.R.; STANTON, V.P. Jr; RIDKER, P.M. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. **JAMA**, v.291, p.2821-2827, 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, p.537-546, 2005.

CHENOT, F.; MONTANT, P.F.; MARCOVITCH, O.; BLAIMONT, M.; DE MEESTER, A.; DESCAMPS, O.S. Co-administration of ezetimibe and simvastatin in acute myocardial infarction. **Eur J Clin Invest.**, v.37(5), p.357-63, 2007.

CHUNG, N.S.; WASAN, K.M. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. **Adv Drug Deliv Rev.** v.56, n.9, p.1315-34, 2004.

CIVEIRA F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis** v. 173, p. 55-68, 2004.

DAVIDSON M.H., McGARRY T., BETTIS R., MELANI L., LIPKA L.J., LEBAUT A.P., SURESH R., SUN S., VELTRI E.P. Ezetimibe Coadministred with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. **Journal of the American College of Cardiology.** v. 40 (12), p. 2125-34i, 2002

DAVIDSON, M.H. Ezetimibe: a novel option for lowering cholesterol. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v.1, n.1, p.11-21, 2003

DAVIES, J.P.; LEVY, B.; IOANNOU, Y.A. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of *NPC1L1*. **Genomics** v.65, n.2, p.137-45, 2000.

DE JONGH S, LILIEN M.R., OP'T ROODT J., STROES E.S., BAKKER H.D., KASTELEIN J.J. Early statin therapy restores endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.** v. 40(12) p. 2117-21. 2002

DISPONÍVEL EM:< <http://www.datasus.gov.br> >. Acesso em: 11 set. 2007.

DISPONÍVEL EM:< <http://www.worldheart.org>>. Acesso em: 11 set. 2007.

DOBIAOSVA, M.; FROHLICH, J. The plasma parameterl log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apo-B-lipoprotein-depleted plasma (FER_{HDL}). **Clin Biochem.** v. 34, p. 583-8, 2001.

DUAN, L.P.; WANG, H.H.; OHASHI, A.; WANG, D.Q. Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc111 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.290 (2), p.G269-76, 2006

DURST R., JANSEN A., EREZ G., BRAVDO R., BUTBUL E., BEN AVI L., SHPITZEN S., LOTAN C., LEITERSDORF E., DEFESCHE J., FRIEDLANDER Y., MEINER V., MISEREZ A.R. The discrete and combined effect of *SREBF-2* and *SCAP* isoforms in the control of plasma lipids among familial hypercholesterolaemia patients. **Atherosclerosis** v. 189, p. 443-450, 2006.

DUVAL C, TOUCHE V, TAILLEUX A, FRUCHART JC, FIEVET C, CLAVEY V, STAELS B, LESTAVEL S. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.340(4), p.1259-63, 2006

EBERLE D, CLEMENT K, MEYRE D, SAHBATOU M, VAXILLAIRE M, LE GALL A, FERRE P, BASDEVANT A, FROGUEL P, FOUFELLE F. *SREBF-1* gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. **Diabetes.** v. 53(8) p.2153-7, 2004.

EDWARDS, J.E.; MOORE R.A. Statins in hypercholesterolaemia: a dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomized, double blind trials. **BMC Farm Pract**, v.4, p.18, 2003

FABINY, D.L.; ERTINGSHAUSEN, G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. **Clin. Chem.**, v.17, n.8, p.696-700, 1971.

FARNIER M., VOLPE M., MASSAAD R., DAVIES M.J., ALLEN C. Effect of c-administering ezetimibe with on-going simvastatin treatment on LDL-C goal attainment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. **International Journal of Cardiology** v. 102, p. 357-332, 2005.

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(6) p. 359-64, 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. 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, p.551-558, 2005b.

FOUCHIER, S.W.; DEFESCHE, J.C.; UMANS-ECKENHAUSEN, M.A.W.; KASTELEIN, J.P. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands". **Hum Genet**, v.109, p.602-615, 2001.

FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. **Diabetes Metab**, v.29, n.3, p.201-5, 2003

FRIEDEWALD W.T., LEVY R.I., FREDRICKSON D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.** v.18(6) p.499-502. 1972

FRIEDLANDER, Y.; SCHWARTZ, S.M.; DURST, R.; MEINER, V.; ROBERTSON, A.S.; EREZ, G.; LEITERSDORF, E.; SISCOVICK, D.S. *SREBP-2* and *SCAP* isoforms and risk of early onset myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v.196, p. 896-904, 2008

GAGNÉ, C.; GAUDET, D.; BRUCKERT, E. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Circulation**. v.105(21), p.2469-75, 2002.

GARCIA, M.J.; REINOSO, R.F.; SANCHEZ NAVARRO, A.; PROUS, J.R. Clinical pharmacokinetics of statins. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.25(6):457-81, 2003.

GENSER, B.; MARZ, W. Low density lipoprotein cholesterol, statins and cardiovascular events: a meta-analysis. **Clin Res Cardiol.**, v.95, n.8, p.393-404, 2006.

GENVIGIR, F.D.V.; SOARES, S.A.; HIRATA, M.H.; WILLRICH, M.A.V.; ARAZI, S.S.; REBECCHI, I.M.M; OLIVEIRA, R.; BERNIK, M.M.S.; 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. **Clinica Chimica Acta**, v.389, p.79–86, 2008.

GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**. v. 343 n. 6257 p. 425-30. 1990

GOLDSTEIN, J.L.; DEBOSE-BOYD, R.A.; BROWN, M.S. Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v.124, p.35-46, 2006.

GOUNI-BERTHOLD, I.; BERTHOLD, H.K.; GYLLING, H.; HALLIKAINEN, M.; GIANNAKIDOU, E.; STIER, S.; KO, Y.; PATEL, D.; SOUTAR, A.K.; SEEDORF, U.; MANTZOROS, C.S.; PLAT, J.; KRONE, W. Effects of ezetimibe and/or simvastatin on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase gene expression: a randomized trial in healthy men. **Atherosclerosis**, V.198(1), P.198-207, 2008.

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. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **J Am Coll Cardiol**, v.44, n.3, p.720-32, 2004

GUZMAN, E.C.R., HIRATA M.H, QUINTAO, E.C.R., HIRATA R.D.C. Association of the apolipoprotein B gene polymorphism with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with lipid profile of high risk for coronary heart disease. **Clin. Chem. Lab. Med**, v. 38, n.8, p 731-736, 2000.

HEGELE, R.A.; GUY, J.; BAN, M.R.; WANG, J. *NPC1L1* haplotype is associated with inter-individual variation in plasma low-density lipoprotein response to ezetimibe. **Lipids Health Dis**, v.4, n.16, 2005.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum.Mut.*, v.1, p.445-466, 1992.

HORDER M, ELSEER RC, GERHARDT W, MATHIEU M, SAMPSON EJ. International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division Committee on Enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). **Eur J Clin Chem Clin Biochem**. v. 29(7) p.435-56.

HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J. Clin. Invest**. v. 109, p. 1125-1131, 2002.

HORTON, J.D.; SHIMOMURA I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. **Curr Opin Lipidol**, v.10, n.2, p.143-50, 1999

HUA X, WU J, GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S., HOBBS H.H. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (*SREBF1*) and localization of *SREBF1* and *SREBF2* to chromosomes 17p11.2 and 22q13. **Genomics**. v.25(3), p.667-73, 1995

HUSSAIN, M.M; STRICKLAND, D.K.; BAKILLAH, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. **Annu Rev Nutr**, v.19, p.141-72, 1999.

IWAKI K., NAKAJIMA T., OTA N., EMI M. A common Ile796Val polymorphism of the human *SREBF* cleavage-activating protein (SCAP) gene. **J Hum Genet** v. 44 p. 421-422 1999.

JACOBSEN, W.; KUHN, B.; SOLDNER, A.; KIRCHNER, G.; SEWING, K.F.; 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, p.1369-78, 2000.

JURADO J., SEIP R., THOMPSON P.D. Effectiveness of Ezetimibe in clinical practice. **Am J Cardiol** v. 93 p. 641-643, 2004.

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 p. 10-7, 2004.

KEYS A. Coronary heart disease in seven countries. **Circulation**, v. 41, suppl I, p. 1, 1970.

KRUIT, J.K.; PLÖSCH, T.; HAVINGA, R.; BOVERHOF, R.; GROOT, P.H.; GROEN, A.K.; KUIPERS, F. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. **Gastroenterology**, v.128(1), p.147-56, 2005.

KIVISTO, K.T.; NIEMI, M.; SCHAEFFELER, E.; PITKALA, 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, p. 523-525, 2004.

KONG, W.J.; JINGWEN, L.; JIANG, J.D. Human low-density lipoprotein gene and its regulation. **J Mol Med**, v.84, p.29-36, 2006

LAHOZ, C.; PEÑA, R.; MOSTAZA, J.M.; LAGUNA, F.; GARCÍA-IGLESIAS, M.F.; TABOADA, M.; PINTÓ, X. Baseline levels of low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein (a) and the AaII polymorphism of the low-density lipoprotein receptor gene influence the response of low-density lipoprotein cholesterol to pravastatin treatment. **Metabolism**, v.54, n.6, p. 741-7, 2005.

LALLOYER, F.; FIÉVET, C.; LESTAVEL, S.; TORPIER, G.; VAN DER VEEN, J.; TOUCHE, V.; BULTEL, S.; YOUS, S.; KUIPERS, F.; PAUMELLE, R.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; TAILLEUX, A. The RXR agonist bexarotene improves cholesterol homeostasis and inhibits atherosclerosis progression in a mouse model of mixed dyslipidemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.26(12), p.2731-7. 2006.

LALLY, S.; TAN, C.Y.; OWENS, D.; TOMKIN, G.H. Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein. **Diabetologia**, v.49, p.1008–16. 2006.

LIU, J.; CHANG, C.C.; WESTOVER, E.J.; COVEY, D.F.; CHANG, T.Y. Investigating the allosterism of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) by using various sterols: in vitro and intact cell studies. **Biochem J.**, v.391(2), p.389-97, 2005.

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, p. 402-408, 2001.

MASSIRER K., HIRATA M.H., SILVA A.E.B., FERRAZ M.L.G., NGUYEN N.Y., HIRATA R.D.C.. Interferon- α receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon- α therapy of patients with chronic hepatitis C. **Braz J Med Biol Res** v. 37 (5) p. 643-647, 2004.

MATHUR, S.N.; WATT, K.R.; FIELD, F.J. Regulation of intestinal NPC1L1 expression by dietary fish oil and docosahexaenoic acid. **J Lipid Res.**, V.48(2), P.395-404, 2007

MEDINA, M.W.; GAO, F.; RUAN, W.; ROTTER, J.I.; KRAUSS, R.M. Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin. **Circulation**, v.118, p.355-362, 2008

MELANI, L.; MILLS, R.; HASSMAN, D.; LIPETZ, R.; LIPKA, L.; LEBEAUT, A.; SURESH, R.; MUKHOPADHYAY, P.; VELTRI, E; Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. **Eur Heart J**, v.24, n.8, p.717-28, 2003

MIKHAILIDIS, D.P.; SIBBRING, G.C.; BALLANTYNE, C.M.; DAVIES, G.M.; CATAPANO, A.L. Meta-analysis of the cholesterol-lowering effect of ezetimibe added to ongoing statin therapy. **Curr Med Res Opin**, v.23, n.8, p.2009-2026, 2007.

MISEREZ, A.R.; MULLER, P.Y.; BARELLA, L.; BARELLA, S.; STAEHELIN, H.B.; LEITERSDORF, E.; KARK, J.D.; FRIEDLANDER, Y. Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v. 164, p. 15-26, 2002.

NAUCK, M.S.; KÖSTER, W.; DÖRFER, K.; ECKES, J.; SCHARNAGL, H.; GIERENS, H.; NISSEN, H.; NAUCK, M.A.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Identification of Recurrent and Novel Mutations in the LDL Receptor Gene in German Patients With Familial Hypercholesterolemia. **Hum Mutat**, v.18(2), p.165-6., 2001.

NCEP: National Cholesterol Education Program – Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA** v. 285 n. 19 p. 2486-97, 2001.

NESS, G.C.; ZHAO, Z.; LOPEZ, D. Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low density lipoprotein receptor protein degradation. **Arch Biochem Biophys**, v. 325, p.242–8, 1996

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.

ORY, D.S. The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. **Trends Cardiovasc Med**, v.14, n.2, p.66-72, 2004

OZAKI K., KUBO T., IMAKI R., SHINAGAWA H., FUKAYA H., OHTAKI K., OZAKI S., IZUMI T., AIZAWA Y. The Anti-Atherosclerotic effects of lipid lowering with atorvastatin in patients with hypercholesterolemia. **J Atheroscler Thromb**, v. 13, p. 216-19, 2006.

PACKARD, C.; CASLAKE, M.; SHEPHERD, J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. **Inter J Cardiol**, v. 74, p.S17–22, 2000.

PEDERSEN, T.R. Coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study experience. **Am J Cardiol**, v.82, n.10B, p.53T-56T, 1998

PFAFFL, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res**, v.29, p.2002-2007, 2001.

PISCIOTTA, L.; FASANO, T.; BELLOCCIO, A.; BOCCHI, L.; SALLO, R.; FRESA, R.; COLANGELI, I.; CANTAFORA, A.; CALANDRA, S.; BERTOLINI, S. Effect of ezetimibe

coadministred with statins in genotype-confirmed heterozygous FH patients. **Atherosclerosis**, v.194, p.e116-e122, 2007

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

RADER, D.J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **Am J Cardiol**.v.90, n.8A, p.62i-70i, 2002

RASOULI M, KIASARI AM, MOKHBERI V. The ratio of apoB/apoAI, apoB and lipoprotein(a) are the best predictors of stable coronary artery disease. **Clin Chem Lab Med**, v.44, n.8, p. 1015-21, 2006.

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, p.779–89. 2005

Resumo das IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** 88 (Supl I): 2-19, 2007

RHAINDS, D.; BRISSETTE, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, p.39-77, 2004.

RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII and B in serum. **Clin. Chem.**, v.32, n.6, p.957-961, 1986.

RIOS DL, VARGAS AF, TORRES MR, ZAGO AJ, CALLEGARI-JACQUES SM, HUTZ MH. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. **Clin Genet**. 63(5):380-5, 2003.

RODNEY RA, SUGIMOTO D, WAGMAN B, ZIEVE F, KERZNER B, STRONY J, YANG B, SURESH R, VELTRI E. Efficacy and safety of coadministration of ezetimibe and simvastatin in African-American patients with primary hypercholesterolemia. **J Natl Med Assoc**. v.98(5), p.772-8. 2006

RODRIGUES, A.C.; CURI, R.; BRITTO, L.R.; REBECCHI, I.M.; HIRATA, M.H.; BERTOLAMI, M.C.; BERNIK, .MM.; DOREA, E.L.; HIRATA, R.D.; Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. **Biochim Biophys Acta**, v,1760(12), p.1866-73, 2006.

ROGERS, S.L.; MAGLIANO, D.J.; LEVISON, D.B.; WEBB, K.; CLARKE, P.J.; GROBLER, M.P.; LIEW, D. A dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomized controlled trials of atorvastatin and simvastatin. **Clin Ther.**, v. 29, n.2, p.242-52, 2007.

ROS, E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v.151, n.2, 357-79, 2000

SAGER, P.T.; MELANI, L.; LIPKA, L.; STRONY, J.; YANG, B.; SURESH, R.; VELTRI, E. Ezetimibe Study Group. Effect of coadministration of ezetimibe and simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein. **Am J Cardiol** v.1592, n.12, p.1414-8., 2003

SALAZAR, L.A., HIRATA M.H, QUINTAO, E.C.R., HIRATA R.D.C. Lipid lowering response of the HMG CoA R inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. **J. Clin Lab. Anal.**, v.14, p.125-131, 2000.

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 p. 1748-50, 1998.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; NAKANDAKARE, E.R.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI S.D.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. **Hum Mutat.**, v.19, n.4, p.462-3 2002b.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. Increasing the sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis of the LDLR gene mutations in Brazilian patients with familial hypercholesterolemia. **Clin Chem Lab Med.**, v.40, n.5, p.441-5, 2002a

SALEK, L.; LUTUCUTA, S.; BALLANTYNE, C.M.; GOTTO JR, A.M.; MARIAN, A.J. Effects of *SREBF-1a* and SCAP polymorphisms on plasma levels of lipids, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy with fluvastatin. **J Mol Med**, v. 80, n.11, p.737-44, 2002.

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

SEHAYEK, E., ONO, J.G., SHEFER S., NGUYEN, L.B., WANG, N., BATTA, A.K., SALEN, G., SMITH, J.D., TALL, A.R., BRESLOW, J.L. Billiary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95 p. 10194-9, 1998.

SEVER, O.S.; DAHLOF, B.; POULTER, N.R.; WEDEL, H.; BEEVERS, G.; CAULFIELD, M.; COLLINS, R.; KJELDSSEN, S.E.; KRISTINSSON, A.; MCINNIS, G.T.; MEHLSSEN, J.; NIEMINEN, M.; O'BRIEN, E.; OSTERGREN, J. ASCOT INVESTIGATORS. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): A multicentre randomized controlled trial. **Lancet**, v.361, p.225+-1158, 2003.

SHIMANO H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Prog Lipid Res.** v. 40(6) p.439-52. 2001

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y; SHIMANO, H.; HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. **Proc Natl Acad Sci** , v.94(23), p.12354-9, 1997.

SHITARA, Y.; SUGYIAMA, 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. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.71-105; 2006

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

SIMON, J.S.; KARNOUB, M.C.; DEVLIN, D.J.; ARREAZA, M.G.; QIU, P.; MONKS, S.A.; SEVERINO, M.E.; DEUTSCH, P.; PALMISANO, J.; SACHS, A.B.; BAYNE, M.L.; PLUMP, A.S.; SCHADT, E.E. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment **Genomics**, v.86, n.6, p.648-656, 2005

SIMONS L.A., Interrelations of lipids and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. **Am J Cardiol.**, v. 57, p. 5G-10G, 1986.

SKARITS, C.; FISCHER, S.; HAAS, O.A. Quantitation of the sterol regulatory element-binding protein mRNA in mononuclear blood cells by competitive RT-PCR. **Clin Chim Acta**, v.336, p. 27-37, 2003.

SORKIN, S.C.; FORESTIERO, F.J.; HIRATA, M.H.; GUZMAN, E.C.R.; CAVALLI, S.A.; BERTOLAMI, M.C.; SALAZAR, L.A.; HIRATA, R.D.C. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem Lab Med.** v.43 (12), p.1339-1345, 2005.

STAMLER J., WENTWORTH D., NEATON J.D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded?. Findings in 356.222 primary screeners of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). **JAMA J. Am. Med. Assoc.** Chicago, v. 256 n. 20 p. 2823-2828, 1986

SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H.; IRIE T. *et al.* Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. **Clin. Chem.** v. 41 p.717-23, 1995.

SULLIVAN D.R., KRUIJSWIJK Z, WEST C.E., KOHLMEIER M, KATAN M.B. Determination of serum triglycerides by an accurate enzymatic method not affected by free glycerol. **Clin Chem.** v. 31(7) p.1227-8. 1985

TALKE, H.; SCHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the warburg optical test. **Klin. Wochenschr.**, v.43; p.174-175, 1965.

TAMEHIRO, N.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KAKEYA, T.; OKUHIRA, K.; SUZUKI, K.; SATO, R.; NAGAO, T.; NISHIMAKI-MOGAMI, T. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. **J Biol Chem.**, v.282(29), p.21090-9. 2007

TELFORD, D.E.; SUTHERLAND, B.G.; EDWARDS, J.Y.; ANDREWS, J.D.; BARRETT, P.H.; HUFF, M.W. The molecular mechanisms underlying the reduction of LDL apoB100 by ezetimibe plus simvastatin. **J Lipid Res**, v.48, p.699–708, 2007

THOMPSON, J.F.; MAN, M.; JOHNSON, K.J.; WOOD, L.S.; LIRA, M.E.; LLOYD, D.B.; BANERJEE, P.; MILOS, P.M.; MYRAND, S.P.; PAULASKIS, J.; MILAD, S.A.; SASIELA, W.J. An association study of 43SNPs in 16 candidate genes with atorvastatin response. **Pharmacogenom J**, v.5, p. 352-358, 2005.

TRIGATTI, B.; RIGOTTI, A.; KRIEGER M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v.11, n.2, p.123-31, 2000

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.** V. 6 p. 24-7, 1969.

TULENKO T.N., SUMMER A.E. The physiology of lipoproteins. **Journal of Nuclear Cardiology**. v.9 n. 6, p.638-49. 2002

VALASEK, M.A.; CLARKE, S.L.; REPA, J.J. Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPARalpha-dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse. **J Lipid Res.**, v.48(12), p.2725-35, 2007.

VAN DER VEEN, J.N.; KRUIT, J.K.; HAVINGA, R.; BALLER, J.F.; CHIMINI, G.; LESTAVEL, S.; STAELS, B.; GROOT, P.H.; GROEN, A.K.; KUIPERS, F. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. **J Lipid Res.**, v.46(3), p.526-34, 2005.

VARRET, M.; ABIFADEL, M.; RABÈS, J.P.; BOILEAU, C. 2007. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. **Clin Genet.** , v.73, p. 1-13. 2008.

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

VEDIE B., JEUNEMAITRE X., MEGNIEN J.L., ATGER V., SIMON A., MOATTI N. A new DNA polymorphism in the 5'untranslated region of the human *SREBF- 1a* is related to development of the atherosclerosis in high cardiovascular risk population **Atherosclerosis** v. 154 p. 589-597. 2001

WANG, A.; YU, B.N.; LUO, C.H.; TAN, Z.R.; ZHOU, G.; WANG, L.S.; ZHANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; ZHOU, H.H. Ile118Val genetic polymorphism of CYP3A4 and its effects on lipid-lowering efficacy of simvastatin in Chinese hyperlipidemic patients. **Eur J Clin Pharmacol**, v.60, p.843-848, 2005.

WEBER, L.W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding protein. **World J Gastroenterol**, v. 10(21), p.3081-3087, 2004

WILLRICH, M.A.; 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. CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. **Clinica Chimica Acta**. 2008 (IN PRESS)

YAMAMOTO A., HARADA-SHIBA M., ENDO M., KUSAKABE N., TANIOKA T., KATO H., SHOJI T. The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. **Atherosclerosis** v. 186, p. 126-131, 2006.

YOSHITOMI, Y.; ISHII, T.; KANEKI, M.; TSUJIBAYASHI, T.; SAKURAI, S.; NAGAKURA, C.; MIYAUCHI, A. Efficacy of a low dose of pitavastatin compared with atorvastatin in primary hyperlipidemia: results of a 12-week, open label study. **J Atheroscler Thromb**, v. 13, p. 108-113, 2006.

YU, L. The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. **Curr Opin Lipidol**, v.19(3), p.263-9, 2008

YU, K.C.; CHEN, W.; COOPER, A.D. LDL receptor-related protein mediates cell-surface clustering and hepatic sequestration of chylomicron remnants in LDLR-deficient mice. **J Clin Invest.**, v. 107(11), p.1387-94, 2001.

ZHANG, C.; SHIN, D.J.; OSBORNE, T.F. A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). **Biochem J**, v.386, p.161-168, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Hospital das Clínicas

da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Caixa Postal, 8091 – São Paulo - Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. NOME DO PACIENTE**

.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:

 BAIRRO: CIDADE:

 CEP: TELEFONE: DDD
 (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeitos de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos tratados com hipocolesterolemiantes

2. 2. PESQUISADOR: EDNA REGINA NAKANDAKARE

CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora

UNIDADE DA USP: Faculdade de Medicina

COLABORADORES NA FM/USP: Mônica de Queiroz Telles Spadoni Neves (Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC e Laboratório de Lípidos (LIM 10)

COLABORADORES NA FCF/USP: Rosario Dominguez Crespo Hirata, Mario Hiroyuki Hirata e Simone Cohen Sorkin Hirata (Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO ☒

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

Os risco médio possível é decorrente da punção venosa que pode causar dor local e formação de hematoma (mancha vermelha) e dos efeitos colaterais do uso da sinvastatina e do ezetimiba, tais como: dor de cabeça, cansaço, dor de barriga, prisão de ventre, diarreia, gases, náuseas e dor nos músculos.

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Meu nome é Edna Regina Nakandakare, sou professora da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP), e estou convidando você a participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo em colaboração com pesquisadores do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP) e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Já se sabe que as pessoas respondem de forma diferente aos medicamentos utilizados no tratamento do colesterol. Algumas pessoas têm efeitos indesejáveis como dor de cabeça, náuseas, dor nos músculos etc. quando tomam a dose usual de remédio para baixar o colesterol. Essas pessoas precisam tomar dose menor do remédio para esses efeitos pararem ou diminuir ou então o remédio tem que ser trocado por outro. Também tem pessoas que precisam tomar doses muito maiores para o remédio ter o efeito desejado. Vários fatores podem contribuir para essas diferenças, mas ainda tem muita coisa que não se sabe. Um dos fatores importantes são as alterações de DNA (que nós chamamos de polimorfismos genéticos) e que podem modificar o RNA (que nos chamamos de expressão gênica) das células. Já se sabe que algumas dessas alterações de DNA estão relacionadas com as diferenças de resposta a medicamentos, mas ainda tem muitas alterações que precisam ser estudadas para conhecer melhor essas relações. Com esse conhecimento vai ser possível saber qual é a melhor dose para cada pessoa, analisando as suas características genéticas.

Nesta pesquisa, vamos medir lipídeos (colesterol e frações, triglicerídeos, apo A1 e apo B) enzimas no seu sangue, antes e depois do tratamento com dois medicamentos (sinvastatina e ezetimiba), que são usados para baixar o colesterol, para verificar como você responde a esse tratamento. Também vamos medir as enzimas ALT e CK para verificar se o tratamento vai causar algum efeito no seu fígado e nos seus músculos. Também vamos colher amostras de sangue para fazer vários testes de DNA e de RNA para verificar se os polimorfismos genéticos estão relacionados com os valores de colesterol e outros gorduras no sangue, com os valores de expressão gênica nas células do sangue e com a resposta ao tratamento.

Vamos estudar os polimorfismos nas proteínas que controlam o colesterol do sangue e das células sanguíneas chamadas HMGCR, LDLR, SREBF1, SREBF2, SCAP, NPC1L1 e outros vamos comparar os seus resultados com os de noventa e nove pacientes com colesterol alto que também vão ser tratados e com duzentas pessoas que tem colesterol normal e não vão ser tratadas. Vamos guardar o seu DNA e RNA para estudos futuros que se fizerem necessários para completar a nossa pesquisa, se você der o seu consentimento para isto.

Caso aceite em participar desta pesquisa, você terá que fazer uma dieta especial (com baixo teor de gordura saturada e de colesterol) durante um mês e depois terá que tomar os medicamentos para diminuir o colesterol. Caso precise de tratamento para baixar o colesterol, o seu médico vai receitar sinvastatina e ezetimibe, de acordo com as suas necessidades, e você participará do estudo três vezes: após um mês de dieta, após um mês de tratamento com sinvastatina e após um mês de tratamento com sinvastatina mais ezetimibe.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Laboratório de Lipídeos (LIM-10) da FM/USP. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e se você usa algum medicamento.

No começo, você vai receber orientação para fazer a dieta especial e não vai usar remédio para baixar o colesterol durante um mês. Quando completar esse período, vamos colher amostras do seu sangue, sendo uma de 10 mL para medir o colesterol, outros lipídeos e as enzimas ALT e CK e outra amostra de 15 mL para fazer os testes de DNA e de RNA. Se o seu colesterol estiver aumentado, o seu médico vai receitar sinvastatina que você tem que tomar durante um mês. Ao final desse período, vamos colher 20 mL de sangue para fazer as mesmas dosagens e seu médico vai receitar sinvastatina mais ezetimibe que você tem que tomar por um mês. Ao final desse período, vamos colher 20 mL de sangue para fazer as mesmas dosagens.

Você poderá ter desconforto com durante a coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Você também poderá ter um ou mais efeitos indesejáveis por causa do tratamento com os remédios para baixar o colesterol. Esses efeitos podem ser: dor de cabeça, cansaço; dor de barriga, prisão de ventre, diarreia, gases, enjôo e dor nos músculos. Se você tiver algum efeito indesejável, avise o seu médico do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FM/USP que vai atender e tratar você.

Não há um benefício direto desta pesquisa para você, mas os resultados da pesquisa vão ajudar a entender a relação entre as características genéticas (DNA) e de expressão gênica (RNA) das pessoas e os valores altos de colesterol do sangue. Esta pesquisa também vai ajudar a entender porque as pessoas têm diferentes respostas quando são tratadas com medicamentos que baixam o colesterol. O conhecimento disso vai melhorar o atendimento médico de milhares de pessoas no futuro. Além disso, não haverá custos para você relativo ao seu tratamento.

Até o momento não há outra forma de realizar este tipo de pesquisa, por isso precisamos estudar em pessoas voluntárias.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Você e seu médico terão acesso aos detalhes da pesquisa e aos resultados dos exames de laboratório que ficarão disponíveis em seu prontuário. Caso seja de seu interesse, os resultados dos testes de DNA e de RNA também ficarão disponíveis para você ao final da pesquisa.

Caso você desista de participar da pesquisa, não haverá nenhum prejuízo de seu atendimento no Hospital das Clínicas da FM/USP.

As amostras de DNA e RNA vão ser armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, sob responsabilidade da Professora Rosario Dominguez Crespo Hirata que é nossa colaboradora nesta pesquisa. Essas amostras servirão para estudar outras alterações no DNA relacionados com o metabolismo do colesterol e com a resposta ao tratamento. Para isso, nós entraremos em contato com você para você autorizar o uso do material em futuros projetos de pesquisa que venham a ser aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa da FM/USP e da FCF/USP, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Suas informações serão mantidas em sigilo e somente serão disponibilizadas com seu consentimento. Somente os pesquisadores envolvidos na pesquisa terão acesso os resultados dos seus testes genéticos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.).

Se tiver algum efeito indesejável quando estiver tomando os medicamentos durante a pesquisa, você deverá entrar em contato com o seu médico do Serviço Endocrinologia e Metabologia do HC-FM/USP para avisá-lo do problema e ele vai lhe orientar o que você deve fazer. Você será atendido no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-FM/USP para tratar desses efeitos e você vai ficar dispensado de continuar na pesquisa.

Não haverá indenização por eventuais danos a sua saúde decorrentes da pesquisa. Os remédios que você vai tomar durante a pesquisa vão ser receitados pelo seu médico. Esses remédios são receitados normalmente pelos médicos para tratar pessoas que tem colesterol alto. Portanto, os danos possíveis a sua saúde durante a sua participação nesta pesquisa são os mesmos que quando você tomar regularmente os remédios para tratar do seu colesterol alto.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato comigo (telefones: 30621255 e 9103-7619) no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo, SP ou com Rosario D.C. Hirata (telefones: 3091-3660 / 30913634) e Simone C. Sorkin (telefone: 8398-1818), no endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 superior, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, a qualquer hora do dia. Você poderá também entrar em contacto com o Comitê de Ética em Pesquisa da FM/USP (CAPPesq) no telefone 3069-6442, e da FCF/USP (telefone: 3091-3677).

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, autorizo o armazenamento dos dados e materiais coletados e estou de acordo que o material a ser utilizado nos testes de DNA e de RNA possam ser utilizados em pesquisas futuras relacionadas com este projeto de pesquisa.

Você quer tomar conhecimento das informações genéticas?. () SIM () NÃO

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

APÊNDICE B

hospital universitário
universidade de são paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. NOME DO PACIENTE _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M F

DATA DE NASCIMENTO _____ / _____ / _____

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____

BAIRRO _____ CIDADE _____

CEP _____ TELEFONE _____

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**1. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:**

“ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E NA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE INDIVÍDUOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM VASTATINAS”

2. PESQUISADOR: Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

CARGO/FUNÇÃO docente (FCF-USP) INSCRIÇÃO CRF: Nº 8876

ÁREA DO HU: Projeto em colaboração com a Divisão de Clínica Médica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

SEM RISCO RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

Prezado Paciente,

Meu nome é Rosario D.C. Hirata, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e estou convidando-o a participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos da Divisão de Clínica Médica que estão fazendo seu atendimento no Hospital Universitário da USP.

Nesta pesquisa, vou medir o colesterol e outros lipídeos no seu sangue e também vou fazer vários testes genéticos para verificar se estão relacionados com o risco de doença do coração e com o resultado do tratamento com atorvastatina, medicamento que diminui o colesterol no sangue. Caso seu colesterol esteja normal você participará do estudo uma única vez. Caso seja muito alto, você terá que fazer uma dieta especial durante um mês e, se necessário, terá que tomar um medicamento para diminuir o colesterol. Caso precise de tratamento, o seu médico recomendará o uso de atorvastatina, de acordo com as suas necessidades, e você participará do estudo três vezes: antes da dieta, após um mês de dieta, e após um mês de tratamento com atorvastatina.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do HU/USP. O risco a sua saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Além de você outros trezentos e noventa e nove pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos.

Inicialmente, serão coletadas cinco amostras de sangue (cerca de 30 mL) para a avaliação do colesterol e de outros exames laboratoriais. Se o seu colesterol for normal, sua participação no estudo se encerra após a análise dos resultados laboratoriais. Se você tiver colesterol alto, será encaminhado para o Setor de Nutrição do HU/USP que lhe indicará uma dieta especial para baixar o colesterol. Após um mês de dieta, serão coletadas três amostras de sangue (cerca de 20 mL) para medir o seu colesterol. Se o colesterol continuar alto, o seu médico receitará atorvastatina que você deverá tomar durante pelo menos um mês. Ao final desse período, serão coletadas três amostras de sangue (cerca de 20 mL) e sua participação neste estudo terminará. As amostras de sangue serão utilizadas para medir colesterol e outros lipídeos, glicemia, hormônios da tireóide e também para realizar os testes genéticos.

Você e seu médico terão acesso aos resultados dos exames de laboratório que ficarão disponíveis em seu prontuário. Caso seja de seu interesse, também disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa. Suas informações serão mantidas em sigilo e somente serão disponibilizadas com seu consentimento. Caso você desista de participar da pesquisa, não haverá nenhuma prejuízo de seu atendimento no Hospital Universitário.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato comigo (telefones: 3091-3660 e 3091-3634), com a Dra. Ivanise M.M. Rebecchi (telefone: 9128-8142), ou com o Dr. Egidio Lima Dorea (telefones: 3039-9433 e 3039-9275), a qualquer hora do dia.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar da presente Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20 _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
pesquisador

assinatura do

legível)

(carimbo ou nome

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo médico do estudo.

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome:.....Paciente nº

Data do convite:...../...../..... Registro

Data de nascimento:...../...../.....

Sexo: **M-1** () **F-2** () Menopausa: **Pré-1** () **Pós-2** ()

Etnia: **Branca** () **Parda** () **Negra** () **Amarela** ()

Hábito de fumar: **Nunca fumou** () **Parou de fumar** () há quanto tempo?.....

Fuma () **Nº de cigarros/dia**.....

Consome bebida alcoólica? **Sim** () **Não** ()

Até 7 doses/sem. () **Mais de 7 doses/sem** ()

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

Diabetes Mellitus ()

Já teve infarte? **Sim** () **Não** () **Há quanto tempo?**.....

É hipertenso? **Sim** () **Não** ()

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

É obeso? **Sim** () **Não** ()

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

Toma medicamento? **Sim** () **Não** ()

Qual(is)? Em que dosagem?

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

Pratica exercício físico? **Sim** () **Não** () **Com que frequência?**.....

HISTÓRICO FAMILIAR

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

Diabetes Mellitus () **Obesidade** () **Hipertensão** ()

Doença cardiovascular () **Quem?**.....

Hipercolesterolemia () **Quem?**.....

Não tem () **Não sabe** ()

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Após dieta (4 semanas)		Após 40 mg sinvastatina (4 sem)		Após 40 mg sinvastatina + 10mg ezetimibe (4 sem)	
BASAL					
Data:		Data:		Data:	
GLI	ALT	GLI	ALT	GLI	ALT
CT	AST	CT	AST	CT	AST
TG	CK	TG	CK	TG	CK
HDL-C	T4L	HDL-C	T4L	HDL-C	T4L
LDL-C	TSH	LDL-C	TSH	LDL-C	TSH
VLDL-C	C U	VLDL-C	C U	VLDL-C	C U

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome:.....**Paciente nº**

Data do convite:...../...../..... Registro

Data de nascimento:...../...../.....

Sexo: **M-1** () **F-2** () Menopausa: **Pré-1** () **Pós-2** ()

Etnia: **Branca** () **Parda** () **Negra** () **Amarela** ()

Hábito de fumar: **Nunca fumou** () **Parou de fumar** () há quanto tempo?.....

Fuma () **Nº de cigarros/dia**.....

Consome bebida alcoólica? **Sim** () **Não** ()

Até 7 doses/sem. () **Mais de 7 doses/sem** ()

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

Diabetes Mellitus ()

Já teve infarte? **Sim** () **Não** () **Há quanto tempo?**.....

É hipertenso? **Sim** () **Não** ()

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

É obeso? **Sim** () **Não** ()

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

Toma medicamento? **Sim** () **Não** ()

Qual(is)? Em que dosagem?

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

Pratica exercício físico? **Sim** () **Não** () **Com que frequência?**.....

HISTÓRICO FAMILIAR

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

Diabetes Mellitus () **Obesidade** () **Hipertensão** ()

Doença cardiovascular () **Quem?**.....

Hipercolesterolemia () **Quem?**.....

Não tem () **Não sabe** ()

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Triagem	Após dieta (4 semanas)		Após 10 mg atorvastatina (4 sem)	
	BASAL			
Data:	Data:		Data:	
GLI	GLI	ALT	CT	ALT
CT	CT	AST	TG	AST
TG	TG	CK	HDL-C	
HDL-C	HDL-C	T4L	LDL-C	
LDL-C	LDL-C	TSH	VLDL-C	
VLDL-C	VLDL-C	C U	CK	

CT: colesterol total/ **GLI:** glicemia/ **TG:** triglicerídeos

ANEXOS

ANEXO A - Cópia do aval dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

São Paulo, 27 de novembro de 2003.

$\Pi^{mo(a)} \cdot S^{r(a)}$.

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata

Departamento de Análise Clínica e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Estudo de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na resposta terapêutica de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com vastatinas” - **Registro CEP: 358/03**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 21 de novembro de 2003, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10-10-1996, item VII.13.d.. **O primeiro relatório está previsto para 21 de novembro de 2004.**

Atenciosamente,

Dra. Maria Teresa Zukni da Costa
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

c.c. Divisão de Clínica Médica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP****Ofício CEP nº 140/2004**

São Paulo, 07 de dezembro de 2004.

**Ilmo(a). Sr(a).
Rosário Domingues Crespo Hirata**

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de dezembro p.p., **APROVOU** o projeto "Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos tratados com hipocolesterolemiantes" (Protocolo nº 283) apresentado por Vossa Senhoria.

Informamos, outrossim, que este projeto será encaminhado à CONEP por se encaixar no GRUPO I – Áreas Temáticas Especiais, sendo necessário aguardar o parecer da CONEP para que o projeto possa ser iniciado.

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

U Endocrinologia

21.07.05

ANDREA RIBEIRO DOS SANTOS

Secretaria do Departamento de Clínica Médica da FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.07.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **551/05**, intitulado: **"Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos tratados com hipocolesterolemiantes."** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Edna Regina Nakandakare**

CAPPesq, 13 de Julho de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos 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 Dominguez Crespo Hirata

Instituição: HU - USP

Área Temática Especial: Genética Humana

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

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

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

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 15 de julho de 2004.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

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 Dominguez 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:

- a) Foi apresentado racional para o cálculo da amostra e a faixa etária dos sujeitos da pesquisa.
- b) Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentada para atender a esclarecimentos sobre os procedimentos.
- c) 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).
- d) Foi apresentada garantia de atendimento e tratamento para os indivíduos que vierem a sofrer reações adversas aos medicamento.
- e) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- f) 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

ANEXO B – Currículo Lattes

Simone Sorkin Arazi

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Simone Sorkin Arazi
Filiação Eduardo Leopoldo Sorkin Kranzenblum e Lylian Beatriz Cohen Kupiec
Nascimento 04/11/1979 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 143630106 SSP - SP - 11/07/2006
CPF 28573515856

Endereço residencial Rua dos Caetés 737 apto 405
 Perdizes - São Paulo
 05016-081, SP - Brasil
 Telefone: 11 21581266

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências
 Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
 Av. Prof. Lineu Prestes 580 Bloco 17
 Butantã - São Paulo
 05508-900, SP - Brasil
 Telefone: 11 30913660

Endereço eletrônico
 e-mail para contato : sisorkin@usp.br
 e-mail alternativo : simone.sorkin@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2004 Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Efeitos de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos sob terapia hipocolesterolemizante
 Orientador: Rosario Dominguez Crespo Hirata

2000 - 2004 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

1994 - 1996 Ensino Médio (2o grau).
 Instituto de Educação Hebraico Brasileiro Renascença, RENA, Brasil

1986 - 1993 Ensino Fundamental (1o grau).
 Instituto de Educação Hebraico Brasileiro Renascença, RENA, Brasil

Atuação profissional**1. Universidade de São Paulo - USP****Vínculo institucional**

1999 - 2000 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: estagio , Carga horária: 12, Regime: Parcial
2002 - 2003 Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Técnico ,

2003 - 2004	Carga horária: 40, Regime: Integral Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2004 - Atual	Vínculo: Aluna de doutorado , Enquadramento funcional: aluna de pós graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

10/1999 - 08/2000	Estágio, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina <i>Estágio:</i> <i>CEATOX - centro de assistência toxicológica</i>
03/2001 - 12/2001	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Participação em projetos:</i> <i>Estudo do polimorfismo genético da apolipoproteína A1 em indivíduos com hipercolesterolemia</i>
08/2001 - 12/2001	Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Linhas de Pesquisa:</i> <i>Biologia Molecular</i>
09/2001 - 10/2001	Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Especificação:</i> <i>Campanha diabetes/colesterol</i>
01/2002 - 03/2003	Serviço Técnico Especializado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Especificação:</i> <i>Técnico médio</i>
09/2002 - 10/2002	Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Especificação:</i> <i>Campanha diabetes e colesterol</i>
06/2003 - 06/2004	Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Linhas de Pesquisa:</i> <i>Biologia Molecular</i>
06/2003 - 06/2004	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Participação em projetos:</i> <i>Estudo do polimorfismo -36delG do gene do SREBP-1a em indivíduos hipercolesterolemia</i>
09/2003 - 10/2003	Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Especificação:</i> <i>Campanha de Diabetes e Colesterol</i>
07/2004 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências

Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Linhas de Pesquisa:
Biologia Molecular , Dislipidemia

07/2004 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Participação em projetos:
Efeitos de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos sob terapia hipocolesterolemizante

2. Centro de Medicina Diagnostica Fleury - FLEURY

Vínculo institucional

2003 - 2003 Vínculo: Estágio curricular , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 30, Regime: Parcial

2004 - 2004 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista técnica , Carga horária: 36, Regime: Parcial

Atividades

03/2003 - 10/2003 Estágio

Estágio:
Estágio curricular

3. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo institucional

1999 - 2000 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagio , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

04/1999 - 01/2000 Estágio, Departamento de Psicobiologia

Estágio:
Estresse oxidativo

Projetos

2004 - Atual Efeitos de genes envolvidos na regulação do metabolismo do colesterol em indivíduos sob terapia hipocolesterolemizante

Descrição: A regulação do colesterol é mediada por proteínas envolvidas na absorção, regulação, síntese e remoção plasmática de colesterol. Os inibidores da síntese (vastatinas) e absorção (ezetimibe) do colesterol são potentes agentes hipocolesterolemizantes. Alterações em vários genes tem sido associadas a diferenças na resposta a agentes terapêuticos diversos. Com a finalidade de avaliar a associação entre genes envolvidos no metabolismo do colesterol e a resposta a hipocolesterolemizantes, serão estudados 100 indivíduos hipercolesterolêmicos, tratados com sinvastatina (40 mg/dia) combinada ou não com ezetimibe (10 mg/dia). DNA, RNA total serão extraídos de amostras de sangue periférico. A expressão de mRNA e dos genes SREBF1, SREBF2, SCAP, HMGR, LDLR, NPC1L1 será avaliada por RT-PCR em tempo real. Os polimorfismos dos genes SREBF e SCAP serão analisados por PCR-RFLP. Espera-se que os resultados obtidos possam contribuir para o conhecimento de fatores e mecanismos envolvidos na variabilidade de resposta ao tratamento com a associação de sinvastatina e ezetimibe e, dessa forma, auxiliar no acompanhamento terapêutico de pacientes

hipercolesterolêmicos.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);

Integrantes: Simone Sorkin Arazi (Responsável); Nadia Preto Godoy; Rosario Dominguez Crespo Hirata; Mario Hiroyuki Hirata

Financiador(es):

2003 - 2004 Estudo do polimorfismo -36delG do gene do SREBP-1a em indivíduos hipercolesterolemia

Descrição: Estudo do polimorfismo -36delG do gene do SREBP-1a em indivíduos hipercolesterolemia. DNA de pacientes hipercolesterolêmicos e controles será extraído e a região contendo o polimorfismo -36delG será amplificada através da técnica de PCR. Os produtos de PCR formados serão digeridos com a enzima de restrição Até e os produtos de restrição serão analisados por eletroforese.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Simone Sorkin Arazi (Responsável); Rosario Dominguez Crespo Hirata; Mario Hiroyuki Hirata

Financiador(es):

2001 - 2001 Estudo do polimorfismo genético da apolipoproteína A1 em indivíduos com hipercolesterolemia

Descrição: A hipercolesterolemia é um distúrbio do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas que pode resultar em aumento da concentração do colesterol total, do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e redução do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C). A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco da aterosclerose e das doenças cardiovasculares (DCV), que se constituem a principal causa de morte em muitos países. As mutações e polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas tem sido indicados como fatores importantes na predisposição à DCV. As alterações genéticas da apolipoproteína A1 (apo A1), principal apoproteína das HDL, tem sido associadas com variações na concentração plasmática de apo A1 e HDL, e com a doença arterial coronariana. O objetivo do presente projeto é estudar a frequência relativa dos alelos do polimorfismo da região promotora do gene da apo A1, assim como a sua associação com os valores séricos do colesterol total e suas frações e da apolipoproteína A.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Simone Sorkin Arazi (Responsável); Rosario Dominguez Crespo Hirata; Mario Hiroyuki Hirata

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Hebraico Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2008	Student Travel Grant Award, American Association for Clinical Chemistry
2005	Menção Honrosa, Universidade de São Paulo

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ARAZI S.S., GENVIGIR, F, WILLRICH, M, HIRATA, M, DOREA, E, BERNIK, M, HIRATA, R
Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. Clinica Chimica Acta. , v.393, p.119 - 124, 2008.
2. WILLRICH, M. A. V., HIRATA, Mario Hiroyuki, GENVIGIR, F. D. V., ARAZI S.S., REBECCHI, I. M. M., RODRIGUES, A. C., BERNIK, M., DOREA, E. L., BERTOLAMI, Marcelo C, FALUDI, A, HIRATA, Rosario Dominguez Crespo
CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. Clinica Chimica Acta. , p.in press - , 2008.
3. GENVIGIR, F. D. V., SOARES, S. A., HIRATA, Mario Hiroyuki, WILLRICH, M. A. V., ARAZI S.S., REBECCHI, I. M. M., OLIVEIRA, R, BERNIK, M., DOREA, E. L., BERTOLAMI, Marcelo C, HIRATA, Rosario Dominguez Crespo
Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. Clinica Chimica Acta. , v.389, p.79 - 86, 2008.
4. SORKIN S.C., FORESTIERO, Francisco Jose, HIRATA, Mario Hiroyuki, GUZMAN, Elizabeth Cr, CAVALLI, Selma Andrea, BERTOLAMI, Marcelo C, SALAZAR, Luis Antonio, HIRATA, Rosario Dc
APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals.. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. , v.43, p.1339 - 1345, 2005.
5. De Oliveira A.C., Suchecki D., COHEN S., D'Almeida V.
Acute stressor-selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. , v.77, p.269 - 273, 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. HIRATA, Mario Hiroyuki, HIGUCHI, M. L., PALOMINO, S., ROGGERIO, A., REZENDE, A., ARAZI S.S., Doi S. Q., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo
Inflammatory response to Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae maybe associated with TLR2 expression in atherosclerotic plaques In: American Association of Clinical Chemistry, 2008, Washington D.C..
Clinical Chemistry. , 2008. v.54. p.A166 - A167
2. ARAZI S.S., GENVIGIR, F. D. V., WILLRICH, M. A. V., HIRATA, Mario Hiroyuki, OLIVEIRA, R, DOREA, E. L., BERNIK, M., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo
mRNA expression of SREBF1, SREBF2 and SCAP transcription factors in peripheral mononuclear cells is modulated by atorvastatin therapy In: American Association of Clinical Chemistry, 2008, Washington.
Clinical Chemistry. , 2008. v.54. p.A150 -
3. ARAZI S.S., WILLRICH, M. A. V., DALLA-VECCHIA, F., HIRATA, Mario Hiroyuki, DOREA, E. L., BERNIK, M., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo
Atorvastatin effects on SREBF1 and SCAP gene expression in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic patients In: 3rd World Congress of the Board of Pharmaceutical

Sciences of FIP (PSWC), 2007, Amsterdam.
<http://www.fip.org/PSWC> , 2007.

4. ARAZI S.S., WILLRICH, M. A. V., DALLA-VECCHIA, F., HIRATA, Mario Hiroyuki, DOREA, E. L., BERNIK, M., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Efeito da atorvastatina sobre os genes SREBF1, SREB2 e SCAP em pacientes hipercolesterolêmicos In: XXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2007, São Paulo.

Rev Soc Cardiol Estado São Paulo , 2007. v.17. p.106 - 106

5. WILLRICH, M. A. V., HIRATA, Mario Hiroyuki, FALUDI, A., BERTOLAMI, Marcelo C, DOREA, E. L., BERNIK, M., GENVIGIR, F. D. V., ARAZI S.S., RODRIGUES, A. C., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Estudo da expressão gênica e polimorfismos da CYP3A5 em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina In: 34o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2007, São Paulo.

Revista Brasileira de Análises Clínicas , 2007.

6. ASSIS, R., HIGUCHI, M. L., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo, PALOMINO, S., ROGERIO, A., REZENDE, A., ARAZI S.S., HIRATA, Mario Hiroyuki

Resposta inflamatória induzida pela Chlamydia pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae na aterosclerose em aneurisma da aorta In: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2007, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas , 2007. v.43. p.97 - 97

7. SORKIN S.C., HIRATA, Mario Hiroyuki, DALLA-VECCHIA, F., NAKANDAKARE, E. R., DOREA, E. L., BERNIK, M., BERTOLAMI, Marcelo C, FALUDI, A., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Efeitos do polimorfismo genético do SREBF1 sobre o perfil lipídico sérico de indivíduos sob terapia hipolipemiante In: 33o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba.

Revista Brasileira de Análises Clínicas , 2006.

8. DALLA-VECCHIA, F., HIRATA, Mario Hiroyuki, SOARES, S. A., SORKIN S.C., WILLRICH, M. A. V., REBECCHI, I. M. M., BERNIK, M., DOREA, E. L., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Efeitos do Polimorfismo G1051A do gene ABCA1 no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos In: 33o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba.

Revista Brasileira de Analises Clínicas , 2006.

9. SORKIN S.C., FORESTIERO, Francisco Jose, HIRATA, Mario Hiroyuki, GUZMAN, Elizabeth Cr, CAVALLI, Selma Andrea, BERTOLAMI, Marcelo C, SALAZAR, Luis Antonio, HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Effects of G-75A polymorphism of the APOA1 gene on serum lipids in female hypercholesterolemic individuals In: 15th IFCC - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2003, Barcelona.

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Berlin: Walter de Gruyter, 2003. v.41. p.s481 - s481

10. FORESTIERO, Francisco Jose, SORKIN S.C., GUZMAN, Elizabeth Cr, BERTOLAMI, Marcelo C, HIRATA, Mario Hiroyuki, HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Efeito do polimorfismo MspI do gene da apolipoproteína AI sobre os lipídeos séricos em indivíduos com hipercolestolemia In: 10o Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2002, São Paulo.

10o Simpósio Internacional de Iniciação Científica , 2002.

Demais produções bibliográficas

1. GENVIGIR, F. D. V., HIRATA, Mario Hiroyuki, SOARES, S. A., WILLRICH, M. A. V., ARAZI S.S., REBECCHI, I. M. M., BERNIK, M., DOREA, E. L., HIRATA, Rosario Dominguez Crespo

Associação do polimorfismo R219K do gene ABCA1 com perfil lipídico sérico menos aterogênico, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

ANEXO C – Artigos Publicados

Clinica Chimica Acta 393 (2008) 119–124

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response

Simone Sorkin Arazi ^{a,*}, Fabiana Dalla Vecchia Genvigir ^a, Maria Alice Vieira Willrich ^a,
 Mario Hiroyuki Hirata ^a, Egidio Lima Dorea ^b, Marcia Bernik ^b, Rosario Dominguez Crespo Hirata ^a

^a School of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^b University Hospital – University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2008

Received in revised form 24 March 2008

Accepted 25 March 2008

Available online 8 April 2008

Keywords:

SREBF1a

SCAP

Gene expression

Statins

Pharmacogenomics

Mononuclear cells

ABSTRACT

Background: The transcription factors SREBP1 and SCAP are involved in intracellular cholesterol homeostasis. Polymorphisms of these genes have been associated with variations on serum lipid levels and response to statins that are potent cholesterol-lowering drugs. We evaluated the effects of atorvastatin on SREBF1a and SCAP mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and a possible association with gene polymorphisms and lowering-cholesterol response.

Methods: Fifty-nine hypercholesterolemic patients were treated with atorvastatin (10 mg/day for 4 weeks). Serum lipid profile and mRNA expression in PBMC were assessed before and after the treatment. Gene expression was quantified by real-time PCR using GAPD as endogenous reference and mRNA expression in HepG2 cells as calibrator. SREBF1 -36delG and SCAP A2386G polymorphisms were detected by PCR-RFLP.

Results: Our results showed that transcription of SREBF1a and SCAP was coordinately regulated by atorvastatin ($r=0.595$, $p<0.001$), and that reduction in SCAP transcription was associated with the 2386AA genotype ($p=0.019$). Individuals who responded to atorvastatin with a downregulation of SCAP had also a lower triglyceride compared to those who responded to atorvastatin with an upregulation of SCAP.

Conclusion: Atorvastatin has differential effects on SREBF1a and SCAP mRNA expression in PBMC that are associated with baseline transcription levels, triglycerides response to atorvastatin and SCAP A2386G polymorphism.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) are transcription factors that play important roles in lipid metabolism and homeostasis mainly by activation of fatty acid and cholesterol synthesis in liver [1,2]. SREBPs belong to the basic helix-loop-helix-leucine zipper family and are encoded by SREBP1 and SREBP2 genes (*SREBF1* and *SREBF2*, respectively) that share 47% homology [3]. *SREBF1* contains 2 promoters that generate 2 transcripts, *SREBF1a* and *SREBF1c*, by alternative splicing at the first exon [4].

SREBF1a is a potent activator of all SREBP-responsive genes, including those that mediate the synthesis of cholesterol, fatty acids, and triglycerides. The roles of *SREBF1c* and *SREBP2* are more restricted than that of *SREBF1a*. *SREBF1c* preferentially enhances transcription of genes required for fatty acid synthesis, while *SREBP2* activates cholesterol synthesis [1].

SREBPs are bound to endoplasmic reticulum membrane and remain inactive when the intracellular cholesterol content is high. Reduction of

intracellular cholesterol by sterol starvation or treatment with lowering-cholesterol drugs triggers the translocation of the SREBPs from the endoplasmic reticulum to the Golgi by the SREBP cleaving activating protein (SCAP), a sensor of the cholesterol intracellular concentration [5]. This displacement is escorted by 2 chaperons Insig-1 and Insig-2 that are proteins tightly bound to the endoplasmic reticulum [6,7].

SREBPs are further sequentially cleaved by Site-1 (SP1) and Site-2 (SP2) proteases and its NH₂-terminal domain (bHLH-Zip) is released and translocated into the nucleus where it binds to sterol regulatory elements (SREs) at the promoter region of target genes and activates their transcription. SREBPs act coordinately with additional transcription factors to achieve full activation of target genes [2,8].

The primary targets of the SREBP1 are genes encoding for enzymes involved in lipid metabolism, such as 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), low-density lipoprotein receptor (LDLR) [9] and others [1].

HMGCR has a key role in cholesterol synthesis and its activity is inhibited by statins that are potent cholesterol-lowering-drugs [10]. It has been shown that the response to statins are highly variable and affected by several factors including polymorphisms in genes involved in drug metabolizing enzymes and transporters as well as in proteins related to the lipid metabolism [11–15].

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes 580, B17, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913660; fax: +55 11 38132197.
 E-mail address: sisorkin@usp.br (S.S. Arazi).

Despite the increasing number of pharmacogenetic studies on statins, only few investigations have addressed the involvement of gene polymorphism in the intracellular homeostasis of cholesterol. *SREBF1* gene has an indel polymorphism in the promoter region (-36del/G) that was associated with an atherogenic lipid profile and increased risk for cardiovascular disease [16]. *SREBF1* -36delG variant was also related to variation on plasma apoA-I in response to fluvastatin [17] but not simvastatin [18]. A common polymorphism of the *SCAP* gene (A2386G, Ile796Val), located at its carboxyl terminal domain that interacts with SREBP1 [19], was found to be a significant predictor of cholesterol and triglyceride responses to simvastatin [18], but not to pravastatin therapy [20].

Besides the evidences of these pharmacogenetic studies, the pharmacogenomic mechanisms of response to statins are yet unclear. It has been demonstrated that atorvastatin regulates gene expression in blood leukocytes before changes in the lipid profile are detectable in serum [21]. Recently, we have demonstrated that atorvastatin inhibits ABCB1 (ATP-binding cassette B1) expression in blood mononuclear cells from hypercholesterolemic individuals with hypercholesterolemia and in HepG2 cells [22]. Moreover, freshly isolated blood mononuclear cells have been used as a surrogate for the cardiovascular tissue to study the correlation between gene expression and atherosclerosis severity [23]. Therefore blood leukocytes seem to be an interesting model to study the statin effects on gene expression in vivo, and may be useful as a biomarker to evaluate pharmacological response. In the present study, we investigated the effects of atorvastatin on expression of *SREBF1a* and *SCAP* transcripts in peripheral blood mononuclear cells and their possible association with gene polymorphisms and lowering-cholesterol response.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and blood samples

We selected 59 unrelated Brazilian outpatients (18 men and 41 women, aged 31 to 77 y) with primary hypercholesterolemia (HC) from those admitted to the University Hospital of the University of Sao Paulo (Sao Paulo City, Brazil) between January 2005 and December 2006. Subjects were European (67.8%) and African descent (32.2%), inhabitants of the Sao Paulo city (Southern Brazil).

Individuals with gastrointestinal, thyroid, liver or renal disease, diabetes, familial dyslipidemia, triglycerides >4.4 mmol/l or under treatment with lipid-lowering drugs, hormone replacement therapy or oral contraceptives were not included in this study.

The HC patients were oriented to follow a low fat diet according to American Heart Association step one diet [24] during 4 weeks. Those with LDL cholesterol >4 mmol/l were treated with atorvastatin 10 mg orally once daily during 4 weeks. Before and after atorvastatin therapy, all patients were evaluated for serum concentrations of lipids, alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CK). No significant variations on ALT and CK serum activities were found in HC patients during atorvastatin treatment. This study protocol was approved by the Ethics Committees of the University Hospital and Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of Sao Paulo and all participants gave written informed consents.

2.2. Biochemical analysis

Antecubital venous blood was collected after a 12-h overnight fast and samples were centrifuged within 3 h from being drawn. Serum total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic methods and serum ALT and CK were measured by kinetic assays using the Advia[®]1650 analyzer (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). Serum LDL and VLDL cholesterol were calculated [25]. Plasma apoA and apoB were determined by nephelometry. AIP is a logarithmically transformed ratio of molar concentrations of triglycerides to HDL-cholesterol. AIP and ApoB/ApoA ratio have been used for evaluation of the risk for cardiovascular disease [26,27].

2.3. Genomic analysis

Genomic DNA was extracted from EDTA-anticoagulated blood by a salting-out procedure [28]. *SREBF1* and *SCAP* polymorphisms were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment analysis. For *SREBF1* -36delG variant we used the sequences of primers previously described [16]. For *SCAP* A2386G polymorphism the primers sequences were: 5'-TTCTGACGACATCGACTG-3' (forward) and 5'-AGAAGGGCAAGGAAAG-3' (reverse).

PCR assays were performed with 50 ng genomic DNA, 200 nmol/l primers (Invitrogen, Brazil), 200 mmol/l dNTPs (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brazil), 1 U DNA polymerase and PCR buffer [75 mmol/l Tris HCl (pH 9.0), 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl₂, 20 mmol/l (NH₄)₂SO₄] (Biotools, Spain). PCR conditions for *SREBF1* polymorphism were: one cycle at 98 °C for 3 min; 32 cycles at 96 °C for 1 min, at 60 °C for 2 min, and 72 °C for 2 min; and one cycle at 72 °C for 10 min. For *SCAP* polymorphism the conditions were: one cycle at 96 °C for 3 min; 38 cycles at 95 °C for 1 min, at 58 °C for 2 min, and 72 °C for 1 min; and once cycle at 72 °C for 10 min. Amplifications were carried out in a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Waltham MA). PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining.

PCR products of *SREBF1* (464 bp) and *SCAP* (342 bp) were digested with 30 U *Apa* I and 2 U *Hpy*CH4 IV, respectively, at 37 °C for 4 h. Restriction fragments were detected by 2% agarose and 10% polyacrylamide gel electrophoresis, respectively for *SREBF1* and *SCAP* fragments, after ethidium bromide staining. *Apa* I recognizes one restriction site that generates 131 and 333 bp fragments for G+ allele and 464 bp for G- allele. *Hpy*CH4 IV recognizes one constitutive site (152 bp) and one polymorphic site that generate a 190 bp fragment for A allele and 123 and 67 bp fragments for G allele.

2.4. Cells and culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated as previously described [29] and immediately used for RNA extraction. HepG2 cells were used as calibrator for gene expression studies. Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/l glutamine, 44 mmol/l sodium bicarbonate, 10,000 U/ml streptomycin and 10,000 U/ml penicillin. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere, containing 5% CO₂. Culture medium was replaced twice a week and cells were trypsinized and sub-cultured every 7 days.

2.5. mRNA expression by real-time PCR

Total RNA was extracted from PMBC and HepG2 cells (1 × 10⁶ to 5 × 10⁶) using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA) as previously described [29]. cDNA was produced from 1 µg of total RNA by Superscript[™] II Reverse Transcriptase and *SREBF1a* and *SCAP* mRNA were measured by TaqMan real-time PCR assay, using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) as reference gene, and mRNA from HepG2 cells was used as calibrator.

The PCR assays were carried out in 96-well plates using a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR protocol consisted of 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 1 min. The primers and probes sequences used for *SREBF1a*, *SCAP* and *GAPD* mRNA detection were obtained in "Assay on demand" format (Applied Biosystems).

The relative quantification value of each target gene was analyzed using a comparative Ct method [30,31]. The following formula was used to calculate the relative amount of the transcript in the sample and normalized to the GAPD as endogenous reference: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where ΔCt is the difference in Ct between the gene of interest and GAPD, and $\Delta\Delta Ct$ for the sample = mean ΔCt of sample - mean ΔCt of the HepG2 cells. The gene expression was interpreted as the increase or reduction in relative mRNA levels after atorvastatin therapy.

2.6. Statistical analysis

The statistical calculations were carried out using SigmaStat Software 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL). Categorical variables were compared by chi-square test or Exact Fisher test. Chi-square analysis also was used to test Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). For *SREBF1* -36del variant, individuals carrying G+G-/G-G- genotypes were grouped and compared with those carrying G+G+ genotype. For *SCAP* A2386G variant, individuals carrying AA genotype were compared with the AG/GG genotypes carriers. Differences on biochemical data and gene expression before and after atorvastatin treatment were compared by Paired t-test. The results from the effects of *SREBF1* and *SCAP* polymorphisms on biochemical data and gene expression were evaluated by student t-test. For data without normal distribution the Mann Whitney and Wilcoxon tests were used. Correlation analyses were performed by Pearson correlation coefficient. Statistical significance was established at the $p < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Patient data

The demographic, clinical and laboratory data of the individuals with hypercholesterolemia (HC) are summarized in Table 1. The study group was predominantly comprised of Caucasian-descent women. Hypertension, obesity and tobacco consumption were found in 49.2%, 28.8%, and 23.7% patients, respectively. These patients had an atherogenic serum lipid profile, including values of the apolipoprotein B (apoB) to apolipoprotein AI (apoAI) ratio (0.37) and atherogenic index of plasma (AIP) (1.08) that indicate high risk for CAD [24,25]. The family history for CAD was found in 55.9% patients.

Table 1
Demographic, clinical and laboratory data of the study group

Variable	Data
Number	59
Age, y	54 ± 10
Women	69.5% (41)
Caucasian	67.8% (40)
Arterial hypertension	49.2% (29)
Obesity (BMI > 30 kg/m ²)	28.8% (17)
Tobacco consumption (current smokers)	23.7% (14)
Family history of CAD	55.9% (33)
Total cholesterol, mmol/l	6.76 ± 0.76
Triglycerides, mmol/l	1.61 ± 0.62
LDL cholesterol, mmol/l	4.54 ± 0.63
HDL cholesterol, mmol/l	1.47 ± 0.32
VLDL cholesterol, mmol/l	0.73 ± 0.28
ApoA1, g/l	1.39 ± 0.29
ApoB, g/l	1.43 ± 0.32
ApoB/ApoA	1.08 ± 0.44
AIP [Log (TG/HDL cholesterol)]	0.37 ± 0.22

Number of individuals in parenthesis. AIP, atherogenic index of plasma; ApoA1, apolipoprotein A1; ApoB, apolipoprotein B; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglycerides; VLDL, very low-density lipoprotein.

In this sample, the frequencies of *SREBF1* -36delG allele and *SCAP* 2386G alleles were 45.8% and 54.2%, respectively (Table 2). These results are similar to that found in other populations (*SREBF1*: 51%–63%; *SCAP*: 43%–53%) [16,18,19,32,33].

3.2. Effects of atorvastatin on gene expression

SREBF1a and *SCAP* mRNA were differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HC individuals in response to atorvastatin. As shown in Fig. 1a, atorvastatin increased mRNA expression in patients with low baseline levels (SR1) and reduced in those with high baseline levels (SR2) ($p < 0.001$). The patterns of *SCAP* baseline expression (low: SC1, high SC2) were also related to the differential expression response to atorvastatin (Fig. 1b). Despite these differences, there was a positive correlation between the variations of *SREBF1a* and *SCAP* expression levels in response to atorvastatin ($r = 0.595$, $p < 0.001$) (Fig. 2).

3.3. Gene expression and serum lipid profile in response to atorvastatin

Anthropometric data, serum lipid profile and allele frequencies of polymorphisms were compared between the patients with different *SREBF1a* and *SCAP* baseline expression patterns, but the differences were not significant (Table 3). Similar results were found when individuals with low *SREBF1a* and *SCAP* mRNA levels (SR1/SC1, $n = 13$) were compared with those with high expression levels (SR2/SC2, $n = 23$) ($p > 0.05$) (data not shown). These data are suggestive that baseline expression levels of these genes are not related to the lipidemic status, *SREBF1* and *SCAP* polymorphisms, or other studied variables of the hypercholesterolemic patients.

Atorvastatin reduced serum level of total cholesterol ($28.0 \pm 8.9\%$), LDL cholesterol ($37.8 \pm 11.7\%$), HDL cholesterol ($6.0 \pm 10.5\%$), VLDL cholesterol ($9.3 \pm 28.2\%$), triglycerides ($9.3 \pm 28.2\%$) and apoB ($25.6 \pm 30.2\%$) and increased apoA1 ($10.0 \pm 36.8\%$). This pattern of response was similar between SR1 and SR2 groups ($p > 0.05$) (Fig. 3a). On the other hand,

Table 2
Genotype distribution and allele frequency of *SREBF1* and *SCAP* polymorphisms

Polymorphism	Genotype distribution			Allele frequency	
<i>SREBF1</i> -36delG	G+G+	G+G-	G-G-	G+	G-
	25.4% (15)	57.6% (34)	17.0% (10)	54.2%	45.8%
<i>SCAP</i> A2386G	AA	AG	GG	A	G
	18.7% (11)	54.2% (32)	27.1% (16)	45.8%	54.2%

Number of individuals in parenthesis.

Fig. 1. *SREBF1a* (a) and *SCAP* (b) mRNA expression levels in PBMC before and after atorvastatin treatment. Data are presented as mean ± SE of log values compared by t-test. SR1 and SR2: *SREBF1a* expression induced and reduced, respectively, by atorvastatin; SC1 and SC2: *SCAP* expression induced and reduced, respectively, by atorvastatin.

serum triglycerides and VLDL cholesterol response were significantly lower in SC2 (2.9%) group when compared with SC1 group (18.2%, $p = 0.041$) (Fig. 3b).

3.4. *SREBF1* and *SCAP* variants and gene expression

As shown in Fig. 4a, baseline *SREBF1a* mRNA expression of SR1 in PBMC did not differ between individuals carrying genotype *SREBF1* G+G+ and the G+G-/G-G- genotypes carriers ($p > 0.05$). Baseline levels of *SCAP* transcripts were also similar between individuals carrying *SCAP* AA and AG+GG genotypes (Fig. 4b). There was also no relationship between baseline expression patterns and allele frequencies

Fig. 2. Correlation analysis between variations of *SREBF1a* and *SCAP* mRNA normalized expression levels in PBMC after atorvastatin treatment. Significant correlation was found as indicated by Pearson correlation coefficient ($r = 0.595$, $p < 0.001$).

Table 3
Demographic, clinical, laboratory and *SREBF1* and *SCAP* polymorphisms data of the study group according to baseline expression patterns

Variable	SR1 (24)	SR2 (35)	p	SC1 (25)	SC2 (34)	p
Age, y	54±8	54±11	0.874	54±9	54±11	0.818
Women	75.0% (18)	65.7% (23)	0.049	64.0% (16)	73.5% (25)	0.617
Caucasian	62.5% (15)	71.4% (25)	0.662	76.0% (19)	61.8% (21)	0.382
Arterial hypertension	62.5% (15)	40.0% (14)	0.152	56.0% (14)	44.1% (15)	0.863
Obesity (BMI>30 kg/m ²)	37.5% (9)	22.9% (8)	0.354	16.0% (4)	38.3% (13)	0.116
Tobacco consumption (current smokers)	25.0% (6)	20.0% (7)	0.892	24.0% (6)	20.6% (7)	0.996
Family history of CAD	54.2% (13)	57.1% (20)	0.968	52.0% (13)	58.8% (20)	0.798
Total cholesterol, mmol/l	6.73±0.89	6.77±0.69	0.849	6.80±0.72	6.73±0.80	0.707
Triglycerides, mmol/l	1.57±0.54	1.63±0.68	0.996*	1.69±0.66	1.54±0.59	0.443
LDL cholesterol, mmol/l	4.56±0.75	4.53±0.54	0.890*	4.54±0.57	4.55±0.68	0.818*
HDL cholesterol, mmol/l	1.43±0.24	1.50±0.35	0.552*	1.46±0.31	1.47±0.32	0.896*
VLDL cholesterol, mmol/l	0.71±0.25	0.74±0.31	0.994*	0.77±0.30	0.70±0.27	0.443
ApoA1, g/l	1.32±0.30	1.45±0.28	0.120	1.34±0.33	1.43±0.26	0.240
ApoB, g/l	1.44±0.40	1.41±0.26	0.742	1.41±0.27	1.43±0.35	0.801
ApoB/ApoA	1.17±0.61	1.02±0.27	0.534*	1.16±0.61	1.03±0.26	0.452*
AIP [Log (TG/HDL cholesterol)]	0.37±0.18	0.37±0.24	0.901	0.40±0.20	0.35±0.23	0.410
<i>SREBF1</i> -36delG, G- allele	37.5%	51.4%	0.192	44.0%	47.0%	0.887
<i>SCAP</i> A2386G, G allele	64.6%	47.1%	0.093	56.0%	33.3%	0.887

Number of individuals in parenthesis. SR1 and SR2, low and high *SREBF1* expression. SC1 and SC2, low and high baseline *SCAP* expression. AIP, atherogenic index of plasma; ApoA1, apolipoprotein A1; ApoB, apolipoprotein B; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglycerides; VLDL, very low-density lipoprotein. Results are presented as mean±SD. p-values for Student's t-test. *Mann-Whitney Rank Test.

for both *SREBF1* ($\chi^2=5.989$, $p=0.05$), and *SCAP* ($\chi^2=1.945$, $p=0.378$) polymorphisms.

Following treatment with atorvastatin, *SCAP* 2386AA genotype carriers showed a significant reduction (5 times) in *SCAP* transcripts ($p=0.019$) (Fig. 4b). However, this effect was not observed in AG+GG genotype carriers (Fig. 4b) or those carrying different *SREBF1* -36delG genotypes (Fig. 4a).

3.5. *SREBF1* and *SCAP* variants and response to atorvastatin

Baseline levels of serum lipids and apolipoproteins were similar between *SREBF1* and *SCAP* genotypes. Serum lipids response to atorvastatin was also not associated with *SREBF1* or *SCAP* variants (Table 4). We have also evaluated the *SREBF1* and *SCAP* combined genotypes

but no associations were found between these combined genotypes and serum lipids before and after atorvastatin therapy (data not shown).

4. Discussion

This study examined the effects of atorvastatin on PBMC mRNA expression of genes involved in intracellular cholesterol homeostasis and its relation with serum lipid profile and genetic polymorphisms. The expression patterns of both *SREBF1a* and *SCAP* showed significant variations before and after treatment with atorvastatin.

Baseline levels of *SREBF1a* transcript has been also measured in PBMC of normolipidemic individuals and it seems to be positively correlated with the transcription levels of *SREBF1c* and other genes

Fig. 3. Serum lipid profile in response to atorvastatin in both *SREBF1a* (a) and *SCAP* (b) mRNA expression groups. TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, very low-density lipoprotein cholesterol; ApoA1, apolipoprotein A1; ApoB, apolipoprotein B.

Fig. 4. Influence of SNPs *SREBF1* -36delG and *SCAP* A2386G on *SREBF1a* (a) and *SCAP* (b) mRNA expression in PBMC, before and after atorvastatin therapy. Data are presented as mean±SE of log values compared by paired t-test.

Table 4

Serum levels of lipids and lipoproteins, before and after 4 weeks of treatment with atorvastatin, according to the *SREBF1* -36delG and *SCAP* Ile796Val polymorphisms in hypercholesterolemic patients

Serum lipids		<i>SREBF1</i> -36delG polymorphism			<i>SCAP</i> Ile796Val polymorphism		
		G+G+ (15)	G+G- / G-G- (44)	<i>p</i>	AA (11)	AG/GG (48)	<i>p</i>
Total cholesterol, mmol/l	Baseline	6.87±1.07	6.72±0.65	0.535	6.72±0.61	6.77±0.81	0.869
	Atorvastatin	5.09±0.86	4.76±0.60	0.108	4.68±0.63	3.64±0.70	0.368
	Variation, %	-25.3±11.1	-28.9±8.0	0.171	-30.3±8.5	-27.5±9.0	0.359
Triglycerides, mmol/l	Baseline	1.44±0.62	1.66±0.62	0.164	1.84±0.60	1.55±0.62	0.117
	Atorvastatin	1.33±0.56	1.43±0.55	0.551	1.57±0.50	1.36±0.55	0.262
	Variation, %	-3.34±33.3	-11.3±26.4	0.348	-14.1±13.5	-8.2±30.6	0.539
HDL cholesterol, mmol/l	Baseline	1.45±0.33	1.47±0.30	0.796	1.38±0.23	1.48±0.23	0.316
	Atorvastatin	1.35±0.35	1.38±0.26	0.753	1.26±0.16	1.39±0.30	0.207
	Variation, %	-6.7±12.2	-5.8±10.0	0.777	-8.1±9.3	-5.6±10.8	0.485
LDL cholesterol, mmol/l	Baseline	4.71±0.88	4.49±0.52	0.283	4.49±0.53	4.56±0.66	0.808
	Atorvastatin	3.08±0.69	2.73±0.56	0.056	2.70±0.61	2.85±0.60	0.479
	Variation, %	-34.1±12.8	-39.0±11.2	0.158	-39.9±11.7	-37.2±11.7	0.509
VLDL-cholesterol, mmol/l	Baseline	0.66±0.28	0.76±0.28	0.167	0.84±0.28	0.70±0.33	0.165
	Atorvastatin	0.60±0.41	0.65±0.25	0.566	0.71±0.23	0.62±0.25	0.253
	Variation, %	-3.34±33.3	-11.3±26.4	0.348	-14.1±13.6	-8.2±30.6	0.539
ApoA1, g/l	Baseline	1.38±0.26	1.39±0.30	0.830	1.36±0.25	1.40±0.30	0.699
	Atorvastatin	1.47±0.24	1.48±0.31	0.811	1.36±0.23	1.50±0.29	0.120
	Variation, %	+5.8±8.8	+4.5±18.1	0.780	+0.7±9.2	+6.2±1.2	0.208
ApoB, g/l	Baseline	1.49±0.29	1.40±0.33	0.378	1.41±0.19	1.42±0.35	0.924
	Atorvastatin	1.01±0.25	1.02±0.25	0.820	0.99±0.16	1.02±0.26	0.864
	Variation, %	-51.6±28.4	-42.9±35.3	0.762	-44.1±14.2	-45.5±36.9	0.901

Number of individuals in parenthesis. ApoA1, apolipoprotein A1; ApoB, apolipoprotein B; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein.

Results are presented as mean±SD. + and - indicate increase and decrease of the variation values. *p*-values for Student's *t*-test.

involved in intracellular cholesterol homeostasis [34]. In human cultured cells, addition of sterols to the media suppressed SREBP1 suggesting that SREBF1a transcription is also controlled by metabolic factors [35]. Nevertheless, we did not find relationship between SREBF1a expression status and serum lipids.

A variable pattern of SREBF1a and SCAP transcription in response to atorvastatin was found in PBMC. This differential pattern may result from variation in intracellular cholesterol since sterols block the SCAP-escorted SREBPs transport from endoplasmic reticulum to the Golgi [36]. This mechanism may explain the upregulation of atorvastatin on SREBF1a and SCAP mRNA expression found in SC1 and SR1 groups. However, the mechanism of the atorvastatin-induced downregulation of the SREBF1a and SCAP transcript levels in SR2 and SC2 groups remains to be elucidated. It is possible that this effect is secondary to the atorvastatin-induced downregulation of SREBF1a expression found in SR2 individuals, considering that 39% (23/59) HC patients had concomitant reduced expression of both genes. Moreover, the positive correlation between the variations on SREBF1a and SCAP transcription levels suggests that these genes are coordinately regulated by atorvastatin.

In this study, lower serum triglycerides and VLDL cholesterol response to atorvastatin was associated with significant reduction of SCAP mRNA expression in PBMC (group SC2). These results suggest that atorvastatin effects on SCAP expression may reflect the intracellular homeostasis of triglycerides and its circulating levels.

Atorvastatin and simvastatin in high doses up regulate SREBP1 and enzymes involved in VLDL production such as fatty acid synthase (FAS), acetyl-coenzyme A carboxylase, DAG acyltransferase and microsomal triglycerides transfer protein in rat liver [37]. However, both statins markedly reduced plasma triglycerides levels, suggesting that different mechanisms may be involved in the hypotriglyceridemic effect of statins at high or low doses. On the other hand, triglycerides inhibit expression of SRE-promoter genes that is positively correlated with cell triglycerides accumulation [38]. Therefore, triglycerides similar to fatty acids are rapid and efficient modulators of SRE-mediated gene expression.

We have demonstrated that SREBF1 -36delG polymorphism is not associated with the levels of mRNA expression in the presence or

absence of atorvastatin. Although this polymorphism is located close to the second Sp1 site of the promoter region [39], it seems to have no effect in transcription regulation at least in PBMC.

The common A2386G polymorphism of SCAP was associated with mRNA expression in response to atorvastatin. Individuals carrying AA genotype had significant reduction of SCAP transcription levels. The role of this variant on gene expression remain to be investigated. We speculate that it may be in linkage disequilibrium with the loss-of-function C-11T promoter polymorphism that was associated with a marked reduction in promoter activity in a luciferase-based expression system [40]. Mutations in the sterol sensing domain of SCAP were found to abolish the feedback regulation of SREBP processing by sterols [41]. These mutations may be also associated with differential pattern in SCAP mRNA expression.

Despite of the relationship of SREBF1 -36delG and SCAP A2386G polymorphisms on serum lipids in response to fluvastatin and simvastatin reported previously [17,18], we did not find significant association between these variants and response to atorvastatin. These results are suggestive that polymorphisms in SREBF1 and SCAP may play a minor role in determining the pharmacological response to statins. It is noteworthy that SREBP1 and SCAP are key modulators of the HMGCR and LDLR expression in cells, therefore polymorphisms that influence gene expression may affect the pharmacodynamics and consequently the pharmacological effects of statins without determining significant variation in serum lipids. In addition, differences in pharmacokinetics of statins and metabolic status of the patient may also contribute to the variation in lowering-lipid responses among SREBF1 and SCAP genotypes carriers.

A potential limitation of our study is the relative small number of cases for genotype-association analyses. Therefore the effect of SREBF1 and SCAP variants on statins response should be tested in larger populations for better evaluation of the pharmacogenetics role of these potent lowering-cholesterol medicines.

In conclusion, atorvastatin has differential effects on SREBF1a and SCAP mRNA expression in PBMC that depends on baseline transcription levels and SCAP A2386G polymorphism. Reduction of SREBF1a and SCAP expression was associated with lower triglycerides response to atorvastatin.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Sonia Q. Doi (USUHS/USA) for the English review and Raquel de Oliveira, Claudia Villazon, Nadia Preto Godoy, Veronica Simoes de Oliveira and Helder Honorato Basques for the technical support. S. S. Arazi, F. D. V. Genvigir and M. A. V. Willrich are recipients of fellowships from FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil. M. H. Hirata and R.D. Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brazil.

References

- [1] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125–31.
- [2] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding protein. *World J Gastroenterol* 2004;10:3081–7.
- [3] Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 1995;25:667–73.
- [4] McPherson R, Gautheier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol* 2004;82:201–11.
- [5] Sakai J, Nohrufft A, Chen D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 1997;272:20213–21.
- [6] Flury I, Garza R, Shearer A, Rosen J, Cronin S, Hampton RY. INSIG: a broadly conserved transmembrane chaperone for sterol-sensing domain proteins. *EMBO J* 2005;24:3917–26.
- [7] Gong Y, Lee JN, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Juxtamembranous aspartic acid in Insig-1 and Insig-2 is required for cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6154–9.
- [8] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86:839–48.
- [9] Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993;75:187–97.
- [10] Istvan E. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 2002;144:S27–32.
- [11] Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP, Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 2004;291:2821–7.
- [12] Schmitz G, Schmitz-Madry A, Ugecsai P. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:164–73.
- [13] Sorkin SC, Forestiero FJ, Hirata MH, Guzman ECR, Cavalli SA, Bertolami MC, et al. APOAI polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1339–45.
- [14] Salazar LA, Hirata MH, Quintao EC, Hirata RD. Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal* 2000;14:125–31.
- [15] Guzman EC, Hirata MH, Quintao EC, Hirata RD. Association of the apolipoprotein B gene polymorphism with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:731–6.
- [16] Védie B, Jeunemaitre X, Megnien JL, Atger V, Simon A, Moatti N. A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBF-1a is related to development of the atherosclerosis in high cardiovascular risk population. *Atherosclerosis* 2001;154:589–97.
- [17] Salek I, Lutucuta S, Ballantyne CM, Gotto Jr AM, Marian AJ. Effects of SREBF-1a and SCAP polymorphisms on plasma levels of lipids, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy with fluvastatin. *J Mol Med* 2002;80:737–44.
- [18] Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics* 2005;5:359–64.
- [19] Iwaki K, Nakajima T, Ota N, Emi M. A common Ile796Val polymorphism of the human SREBP cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J Hum Genet* 1999;44:421–2.
- [20] Fan YM, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Knuuti J, et al. Effects of pravastatin therapy on serum lipids and coronary reactivity are not associated with SREBP cleavage-activating protein polymorphism in healthy young men. *Clin Genet* 2001;60:319–21.
- [21] Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V, Lunnon MW, Haskard DO, Naumova RP. Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of homeostasis, inflammation and apoptosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:677–85.
- [22] Rodrigues AC, Curi R, Britto LR, Rebbecki IM, Hirata MH, Bertolami MC, et al. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1866–73.
- [23] Kang JG, Patino WD, Matoba S, Hwang PM. Genomic analysis of circulating cells: a window into atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:163–8.
- [24] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association nutrition committee. *Circulation* 2006;114:82–96.
- [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] Dobiasova M. Atherogenic index of plasma [log(triglycerides/HDL-cholesterol)]: theoretical and practical implications. *Clin Chem* 2004;50:1113–5.
- [27] Rasouli M, Kiasari AM, Mokheri V. The ratio of apoB/apoA1, apoB and lipoprotein (a) are the best predictors of stable coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1015–21.
- [28] 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;44:1748–50.
- [29] Massier KB, Hirata MH, Silva AE, Ferraz ML, Nguyen NY, Hirata RD. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis C. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:643–7.
- [30] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [31] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [32] Rios DL, Vargas AF, Torres MR, Zago AJ, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet* 2003;63:380–5.
- [33] Durst R, Jansen A, Erez G, Bravo R, Butbul E, Ben Avi L, et al. The discrete and combined effect of SREBF-2 and SCAP isoforms in the control of plasma lipids among familial hypercholesterolaemia patients. *Atherosclerosis* 2006;189:443–50.
- [34] Skarits C, Fischer S, Haas OA. Quantitation of the sterol regulatory element-binding protein mRNA in mononuclear blood cells by competitive RT-PCR. *Clin Chim Acta* 2003;336:27–37.
- [35] Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 1997;99:838–45.
- [36] Brown JL, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2002;10:237–45.
- [37] Roglans N, Verd JC, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, et al. High doses of atorvastatin and simvastatin induce key enzymes involved in VLDL production. *Lipids* 2002;37:445–54.
- [38] Densupsoontorn N, Worgall TS, Seo T, Hamai H, Deckelbaum RJ. Fatty acid supplied as triglyceride regulates SRE-mediated gene expression as efficiently as free fatty acids. *Lipids* 2007;42:885–91.
- [39] Zhang C, Shin DJ, Osborne TF. A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). *Biochem J* 2005;386:161–8.
- [40] Cao H, Miskie BA, Hegele RA. Functional promoter polymorphism in SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *J Hum Genet* 2002;47:492–6.
- [41] Yabe D, Xia Z, Adams CM, Rawson RB. Three Mutations in sterol-sensing domain of SCAP block interaction with insig and render cleavage insensitive to sterols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16672–7.

Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals

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

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

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

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

Received 13 September 2007; received in revised form 14 November 2007; accepted 28 November 2007

Available online 15 January 2008

Abstract

Background: *ABCA1* plays an important role in HDL metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABCA1* gene were associated with variation in plasma HDL-c.

Methods: The effect of the *ABCA1* SNPs C-14T, R219K and of a novel variant C-105T on serum lipids was investigated in 367 unrelated Brazilian individuals (224 hypercholesterolemic and 143 normolipidemic). The relation between *ABCA1* SNPs and the lipid-lowering response to atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) was also evaluated in 141 hypercholesterolemic (HC) individuals. The polymorphisms were detected by PCR-RFLP and confirmed by DNA sequencing.

Results: Linkage disequilibrium was found between the SNPs C-105T and C-14T in the HC group. HC individuals carrying -105CT/TT genotypes had higher serum HDL-c and lower triglyceride and VLDL-c concentrations as well as lower TG/HDL-c ratio compared to the -105CC carriers ($p < 0.05$). The R219K SNP was associated with reduced serum triglyceride, VLDL-c and TG/HDL-c ratio in the HC group ($p < 0.05$), and with an increased serum apoA1 in NL individuals. The effects of *ABCA1* SNPs on basal serum lipids of HC individuals were not modified by atorvastatin treatment.

Conclusions: The *ABCA1* SNPs R219K and C-105T were associated with a less atherogenic lipid profile but not with the lowering-cholesterol response to atorvastatin in a Brazilian population.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: ABCA1; Pharmacogenetics; Plasma lipids; SNPs; Statins

1. Introduction

The association between high levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and a decreased risk for cardiovascular disease has been well established through epidemiological and clinical studies [1–3]. This relationship is supported by the potential antiatherogenic properties of HDL, including its involvement on reverse cholesterol transport (RCT), in which cholesterol

from peripheral tissues, including foam cells of the arterial wall, is returned to the liver for elimination through the biliar system [4].

The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) has an essential role on regulation of HDL metabolism [5,6] and there is strong evidence that ABCA1 is also a key regulator of RCT [7]. This protein mediates the transport of cholesterol, phospholipids, and other lipophilic molecules across cellular membranes, where they are removed from cells by lipid-poor HDL apolipoproteins [8]. In fact, ABCA1-mediated assembly of phospholipid and free cholesterol with apolipoprotein A-I plays an important role in HDL biogenesis [9,10].

Mutations in the ABCA1 gene cause Tangier disease and familial hypoalphalipoproteinemia disorders characterized by

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 B.17 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913660; fax: +55 11 38132197.
E-mail address: fabidalla@usp.br (F.D.V. Genvigir).

deficiency in cholesterol efflux from cells and reduced HDL-c in serum, as well as an increased risk for atherosclerosis [11–15]. In addition, many common variants of *ABCA1* have been associated with a wide range of clinical and biochemical phenotypes including the variations on HDL-c serum levels [16,17]. The R219K single nucleotide polymorphism (SNP) has been associated with protection against coronary artery disease (CAD) risk and severity [18–23]. This protective effect appears to be related to an increased HDL-c and/or reduced triglyceride levels [18,21,24,25], but these results were not reproduced in all studies [19,20,26]. Other SNPs located in the promoter region of *ABCA1*, such as C-14T (also described as C69T), were associated with the severity of atherosclerosis and increased risk

for CAD apparently without changing the plasma lipid levels [16,17,27].

It is well known that treatment with HMGCoA reductase inhibitors, known as statins, reduce the relative risk of coronary events, primarily by lowering the low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) serum levels [28]. In addition, the effects of statins on other serum lipids are highly variable and they have been associated with changes in basal concentrations of HDL-c [29,30].

The present study describes the effects of the novel variant C-105T and other SNPs of *ABCA1* on serum lipid profile and on the lowering-cholesterol response to atorvastatin in a population of Brazilian individuals.

Fig. 1. Identification of the *ABCA1* C-105T and C-14T polymorphisms by RFLP and DNA sequencing. A) C-105T polymorphism: lane 1: DNA ladder 10 bp; lane 2: PCR product; lanes 3, 4, 6–8: CC genotype; lane 5: CT genotype; lane 9: TT genotype. B) C-14T polymorphism: lane 1: PCR product; lane 2: DNA ladder 10 bp; lanes 4, 5 and 8: CC genotype; lanes 3, 7, 9 and 10: CT genotype; lane 6: TT genotype. The transcription starting site is indicated (G⁺) [39].

2. Materials and methods

2.1. Subjects and study protocol

From 2003 to 2006, 367 unrelated individuals (112 men and 255 women, aged 29 to 81 y) were selected among the outpatients evaluated for the presence of risk factors for CAD at the Institute Dante Pazzanese of Cardiology and the University Hospital of the Sao Paulo University (Sao Paulo City, Brazil). Two-hundred twenty-four individuals had primary hypercholesterolemia (HC), as defined by the NCEP (National Cholesterol Education Program) [31], and 143 were normolipidemic (NL) with total cholesterol up to 5.18 mmol/l and triglyceride <1.69 mmol/l. Subjects with thyroid, liver or renal disease, diabetes, hypertriglyceridemia (triglyceride >4.52 mmol/l) or individuals under treatment with lipid-lowering drugs, hormone replacement or oral contraceptives were excluded from the study.

Information on age, height and weight, medication in use, cigarette smoking, alcohol consumption, physical activity, as well as history of menopause, hypertension, obesity, and family history of CAD was recorded. Current cigarette smoking was defined as a daily intake of one or more cigarette. 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 per week.

Each individual declared his ethnic group during the interview. Anthropometric measurements, such as body mass index (BMI), were taken from each participant. Subjects with BMI >30 kg/m² were classified as obese [32]. Individuals with systolic/diastolic blood pressure $\geq 140/90$ mm Hg or under antihypertensive therapy were considered hypertensive [33].

The HC patients were oriented to follow a low fat diet according to the American Heart Association recommendation [34] during 4 weeks, in order to exclude those with diet-induced hypercholesterolemia. After this screening, those with LDL cholesterol higher than 4.14 mmol/l ($n=141$) were treated with atorvastatin (10 mg orally once-a-day) for 4 weeks. Before and after administration of atorvastatin, all patients were evaluated for serum concentrations of lipids, alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CK). Serum lipids were measured to monitor the response to atorvastatin. ALT and CK were determined in order to detect possible adverse drug reactions. The study protocol was approved by the local Ethical Committees and informed consent was obtained from each participant.

2.2. Measurement of lipid and lipoproteins

Blood samples were collected after a 12-h fasting. Patients receiving atorvastatin had blood drawn prior and after the 4-week treatment. Total cholesterol, HDL-c and triglycerides (TG) were measured using routine enzymatic methods. Values of LDL-c and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-c) were calculated using the Friedewald formula [35]. Plasma apolipoprotein AI (apoAI) and apolipoprotein B (apoB) were determined by nephelometry. ApoB/apoAI and TG/HDL-c ratios were also estimated [36,37]. Serum ALT and CK tests were determined by kinetic methods using the ADVIA®1650 analyzer (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY).

2.3. DNA extraction and ABCA1 genotyping

Genomic DNA was extracted from EDTA-treated whole blood samples using a salting-out method [38]. *ABCA1* C-14T and R219K SNPs were detected by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) assays. The primers for C-14T (forward: 5'-CTCCACGTGCTTCTGCTGA-3', and reverse 5'-CACTCACTCTCGCTCGCAAT-3') and R219K (forward: 5'-GAAGAGATGATTCAACTTGGTGAC-3', and reverse 5'-GCCCAAAAGTCTGAAAGAACAC-3') were selected using the *ABCA1* reference sequence (GenBank Accession number AF275948) previously described [39].

PCR assays contained 100 ng genomic DNA, 200 nmol/l primers (Invitrogen Corporation, CA, USA), 200 μ mol/l dNTPs (GE Healthcare, Buckinghamshire, England), 1.0 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, Madrid, Spain) in 50 μ l total volume.

The PCR thermal cycling conditions consisted of initial incubation at 98 °C for 3 min, followed by 29 cycles at 94 °C for 1 min, 57 °C for 2 min and 72 °C for 1 min for C-14T polymorphism or by 32 cycles at 94 °C for 45 s, 58 °C for

1.5 min and 72 °C for 1.5 min for R219K SNP and a final extension period of 72 °C for 10 min. Amplification was carried out in a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research Inc., MA). PCR products of C-14T and R219K SNPs (173 bp and 295 bp respectively) were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining. PCR products of the C-14T and R219K SNPs were initially digested with the MspI and StyI endonucleases (New England Biolabs Inc., Ipswich MA) respectively, at 37 °C. Restriction fragments were identified by 8% polyacrylamide gel electrophoresis after silver staining.

As we analyzed the C-14T SNP, we found that some DNA samples showed an abnormal RFLP profile suggesting the presence of a novel polymorphism in the promoter region of the *ABCA1* that was confirmed by DNA sequencing. This new polymorphism received the name C-105T (the submitted SNP number: NCBI dbSNP ss_76859909) according to the transcription starting site of the *ABCA1* sequence [39].

In order to detect both the C-14T and the C-105T *ABCA1* SNPs using the same PCR product, we developed new RFLP strategies using BsmAI and AlwNI endonucleases (New England Biolabs) that recognize the -14T and -105T alleles, respectively. Reaction mixtures were incubated at temperatures specified by the manufacturer and restriction fragments were identified by 8% polyacrylamide gel electrophoresis after silver staining. Identifications of the *ABCA1* C-14T and C-105T genotypes by RFLP are shown in Fig. 1. The accuracy of the genotyping was evaluated by performing duplicate analysis of 20% of the samples randomly selected. In addition, control samples containing heterozygous *ABCA1* polymorphism were included in each run.

2.4. DNA sequencing

Purified PCR products were sequenced in both directions using the capillary electrophoresis system MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire,

Table 1
Anthropometric, demographic, clinical and laboratory data in the studied population

Variables	NL (143)	HC (224)	<i>p</i>
Age (y)	47 $\pm$ 7	55 $\pm$ 11	<0.001
BMI (kg/m ²)	26 $\pm$ 4	27 $\pm$ 4	0.004
Gender (men/women) (%)	27/73	33/67	0.281
Ethnicity ^a (European/African) (%)	63/37	67/33	0.512
Obesity (%)	13	26	0.003
Hypertension (%)	41	55	0.009
Menopause (%)	31	74	<0.001
Cigarette smoking (%)	19	15	0.449
Alcohol consumption (%)	32	29	0.470
Physical activity (%)	47	48	0.802
Family history of CAD (%)	41	54	0.013
<i>Basal serum lipids</i>			
Total cholesterol (mmol/l)	4.48 $\pm$ 0.47	6.66 $\pm$ 1.22	<0.001
LDL-c (mmol/l)	2.56 $\pm$ 0.47	4.40 $\pm$ 1.11	<0.001
HDL-c (mmol/l)	1.48 $\pm$ 0.34	1.48 $\pm$ 0.39	0.703
VLDL-c (mmol/l)	0.44 $\pm$ 0.15	0.78 $\pm$ 0.34	<0.001
Triglyceride (mmol/l)	0.94 $\pm$ 0.32	1.67 $\pm$ 0.73	<0.001
ApoAI (g/l)	1.42 $\pm$ 0.28	1.39 $\pm$ 0.29	0.211
ApoB (g/l)	0.85 $\pm$ 0.22	1.31 $\pm$ 0.30	<0.001
ApoB/apoAI	0.63 $\pm$ 0.22	0.99 $\pm$ 0.36	<0.001
TG/HDL-c	0.69 $\pm$ 0.34	1.27 $\pm$ 0.81	<0.001

Number of individuals in parenthesis. Individuals with BMI ≥ 30 kg/m² were classified as obese [32] and those with systolic/diastolic blood pressure equal or over to 140/90 mm Hg or were under antihypertensive therapy were considered hypertensive [33]. Continuous variables are presented as mean $\pm$ SD of log transformed data (exception of the age) and were compared by *t*-test. Categorical variables were compared by χ^2 test.

HC, hypercholesterolemic patients; NL, normolipidemic patients; apoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol.

^a Seven patients did not inform their ethnicity (4 HC and 3 NL).

U.K.) and a standard protocol for the Terno Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare). Results from DNA sequencing are shown in Fig. 1.

2.5. Statistical analysis

Categorical variables were compared by χ^2 test or Exact Fisher test. χ^2 also was used to test Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). To evaluate the association between *ABCA1* genotype and serum lipid concentration, individuals carrying the homozygous form of the less common allele were grouped with the heterozygous carriers. Continuous variables were presented as means $\pm$ SD and the effects of the polymorphisms and haplotypes on serum lipid profile were evaluated by *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA), respectively. Variables without normal distribution were log transformed for analysis. The linkage disequilibrium (LD) between 2 SNPs was measured using the *D'* index and it was determined using SNPAnalyzer software [40].

Univariate logistic regression analysis was used to establish correlations between hypercholesterolemia and independent variables. The results of this analysis were adjusted for the covariates: age, gender, ethnics, hypertension, obesity, smoking and physical activity. Statistical tests were performed by SAS System for Windows software version 8.02 (SAS Institute Inc., 1999–2001, Cary, NC). Significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

Anthropometric, demographic and clinical results of the studied group are shown in Table 1. Seven patients did not inform their ethnic group (4 HC and 3 NL). Frequencies of gender, ethnicity, smoking, alcohol consumption and physical activity were similar between HC and NL groups ($p > 0.05$). However, mean age, BMI values and frequencies of obesity, hypertension, family history of CAD or menopausal women were higher in HC group when compared with NL ($p < 0.05$).

As expected, concentrations of basal serum lipids were higher in HC than in NL patients ($p < 0.001$), with exception of HDL-c and apoAI that were not significantly different between

Table 2
Genotype and allele frequencies for *ABCA1* R219K, C-14T and C-105T polymorphisms in the NL and HC groups

Polymorphisms	NL (143)	HC (224)	
R219K genotypes, %			
RR	37.8 (54)	33.9 (76)	
RK	43.3 (62)	48.2 (108)	$\chi^2 = 0.857$
KK	18.9 (27)	17.9 (40)	$p = 0.652$
K allele	40.6	42.0	
C-14T genotypes, %			
CC	42.0 (60)	43.3 (97)	
CT	48.9 (70)	43.3 (97)	$\chi^2 = 2.000$
TT	9.1 (13)	13.4 (30)	$p = 0.363$
T allele	33.6	35.0	
C-105T genotypes, %			
CC	97.2 (139)	96.4 (216)	
CT	2.8 (4)	3.1 (7)	Exact Fisher test $p = 1.000$
TT	0 (0)	0.5 (1)	
T allele	1.4	2.0	

Number of individuals in parenthesis.
Hardy–Weinberg Equilibrium:

R219K SNP: $\chi^2 = 0.76$ ($p > 0.05$).

C-14T SNP: $\chi^2 = 0.02$ ($p > 0.05$).

C-105T SNP: $\chi^2 = 7.05$ ($p < 0.01$).

Table 3
Effects of *ABCA1* R219K polymorphism on basal serum lipids in NL and HC groups

Variables	NL genotypes (143)			HC genotypes (224)		
	219RR (54)	219RK/ KK (89)	<i>p</i>	219RR (76)	219RK/ KK (148)	<i>p</i>
Total cholesterol (mmol/l)	4.47 $\pm$ 0.51	4.49 $\pm$ 0.45	0.723	6.67 $\pm$ 1.17	6.64 $\pm$ 1.23	0.822
LDL-c (mmol/l)	2.59 $\pm$ 0.48	2.55 $\pm$ 0.44	0.696	4.39 $\pm$ 1.11	4.41 $\pm$ 1.13	0.890
HDL-c (mmol/l)	1.43 $\pm$ 0.32	1.51 $\pm$ 0.34	0.150	1.43 $\pm$ 0.38	1.50 $\pm$ 0.38	0.157
VLDL-c (mmol/l)	0.44 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.15	0.557	0.85 $\pm$ 0.40	0.72 $\pm$ 0.29	0.036
Triglyceride (mmol/l)	0.96 $\pm$ 0.32	0.93 $\pm$ 0.32	0.557	1.86 $\pm$ 0.88	1.58 $\pm$ 0.64	0.039
ApoAI (g/l)	1.36 $\pm$ 0.29	1.46 $\pm$ 0.27	0.035	1.37 $\pm$ 0.28	1.40 $\pm$ 0.30	0.513
ApoB (g/l)	0.88 $\pm$ 0.24	0.84 $\pm$ 0.21	0.416	1.31 $\pm$ 0.33	1.31 $\pm$ 0.28	0.876
ApoB/apoAI	0.67 $\pm$ 0.23	0.60 $\pm$ 0.21	0.074	1.00 $\pm$ 0.33	0.99 $\pm$ 0.37	0.732
TG/HDL-c	0.73 $\pm$ 0.34	0.66 $\pm$ 0.34	0.266	1.48 $\pm$ 0.96	1.17 $\pm$ 0.69	0.030

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean $\pm$ SD of log transformed data. Results were compared by *t*-test.

ApoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; HC, hypercholesterolemic patients; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; NL, normolipidemic patients; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol.

these 2 groups (Table 1). The apoB/apoAI and TG/HDL-c ratios in NL group were lower than in HC patients ($p < 0.001$). No significant variations in ALT and CK serum activities were found in patients treated with atorvastatin (data not shown).

Genotype and allele frequencies of *ABCA1* R219K, C-14T and C-105T SNPs in NL and HC groups are shown in Table 2.

Table 4
Effects of *ABCA1* C-14T SNP on basal serum lipids in NL and HC groups

Variables	NL genotypes (143)			HC genotypes (224)		
	-14CC (60)	-14CT/TT (83)	<i>p</i>	-14CC (97)	-14CT/TT (127)	<i>p</i>
Total cholesterol (mmol/l)	4.45 $\pm$ 0.39	4.51 $\pm$ 0.52	0.739	6.68 $\pm$ 1.29	6.63 $\pm$ 1.14	0.778
LDL-c (mmol/l)	2.51 $\pm$ 0.41	2.62 $\pm$ 0.49	0.276	4.43 $\pm$ 1.16	4.38 $\pm$ 1.09	0.796
HDL-c (mmol/l)	1.53 $\pm$ 0.34	1.45 $\pm$ 0.34	0.262	1.50 $\pm$ 0.41	1.45 $\pm$ 0.36	0.466
VLDL-c (mmol/l)	0.44 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.15	0.922	0.75 $\pm$ 0.36	0.78 $\pm$ 0.31	0.138
Triglyceride (mmol/l)	0.94 $\pm$ 0.33	0.95 $\pm$ 0.32	0.922	1.62 $\pm$ 0.79	1.71 $\pm$ 0.69	0.151
ApoAI (g/l)	1.45 $\pm$ 0.30	1.40 $\pm$ 0.26	0.367	1.40 $\pm$ 0.32	1.38 $\pm$ 0.27	0.639
ApoB (g/l)	0.81 $\pm$ 0.19	0.88 $\pm$ 0.24	0.064	1.30 $\pm$ 0.33	1.31 $\pm$ 0.27	0.705
ApoB/apoAI	0.59 $\pm$ 0.20	0.66 $\pm$ 0.23	0.065	0.98 $\pm$ 0.32	1.00 $\pm$ 0.38	0.599
TG/HDL-c	0.67 $\pm$ 0.36	0.70 $\pm$ 0.33	0.500	1.23 $\pm$ 0.85	1.31 $\pm$ 0.77	0.147

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean $\pm$ SD of log transformed data. Results were compared by *t*-test.

ApoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; HC, hypercholesterolemic patients; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; NL, normolipidemic patients; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol.

Table 5
Effects of *ABCA1* C-105T SNP on basal serum lipids in NL and HC groups

Variables	NL genotypes (143)			HC genotypes (224)		
	-105CC (139)	-105CT/ TT (4)	<i>p</i>	-105CC (216)	-105CT/ TT (8)	<i>p</i>
Total cholesterol (mmol/l)	4.48±0.47	4.87±0.28	0.098	6.66±1.22	6.37±0.85	0.570
LDL-c (mmol/l)	2.56±0.47	2.87±0.23	0.175	4.40±1.14	4.04±0.70	0.469
HDL-c (mmol/l)	1.48±0.34	1.50±0.31	0.825	1.48±0.36	1.81±0.31	0.009
VLDL-c (mmol/l)	0.44±0.15	0.49±0.15	0.360	0.78±0.34	0.49±0.10	0.010
Triglyceride (mmol/l)	0.94±0.32	1.07±0.36	0.360	1.69±0.73	1.07±0.23	0.010
ApoAI (g/l)	1.42±0.28	1.48±0.21	0.636	1.38±0.29	1.56±0.25	0.090
ApoB (g/l)	0.85±0.23	0.87±0.10	0.736	1.31±0.30	1.24±0.31	0.557
ApoB/apoAI	0.63±0.22	0.60±0.16	0.977	1.00±0.36	0.80±0.14	0.138
TG/HDL-c	0.69±0.34	0.78±0.48	0.673	1.30±0.81	0.60±0.16	0.001

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean±SD of log transformed data. Results were compared by *t*-test.

ApoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; HC, hypercholesterolemic patients; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; NL, normolipidemic patients; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol.

The genotype distribution of the R219K and C-14T variants were in HWE in our sample population ($p>0.05$). On the contrary, the C-105T SNP showed deviations from HWE ($p<0.05$).

Frequencies of the less common *ABCA1* alleles in HC individuals (219K, 42.0%; -14T, 35.0%; -105T, 2.0%) were similar to those found in the NL group (219K, 40.6%; -14T, 33.6%; -105T, 1.4%; $p>0.05$) (Table 2). There were no differences in gender frequencies between polymorphism carriers and non-carriers (data not shown).

In the NL group, the C-14T and C-105T SNPs were not associated with differences in basal serum lipid concentration, but 219RK/KK genotype carriers had higher apoAI ($p=0.035$)

serum concentrations than the 219RR genotype carriers (Tables 3, 4 and 5).

In the HC group, the 219RK/KK genotype carriers had lower basal serum triglyceride ($p=0.039$) and VLDL-c ($p=0.036$), and a lower TG/HDL-c ratio ($p=0.030$) than those carrying the 219RR genotype (Table 3). Likewise, the -105T allele (-105CT/TT genotypes) was associated with lower basal serum triglyceride ($p=0.010$) and VLDL-c ($p=0.010$), a lower TG/HDL-c ratio ($p=0.001$) and higher HDL-c ($p=0.009$) serum concentration (Table 5). On the other hand, C-14T SNP was not associated with differences in serum lipids in hypercholesterolemic patients (Table 4). These results are suggestive that *ABCA1* R219K SNP and possibly the novel variant C-105T are associated with a less atherogenic serum lipid profile.

A linkage disequilibrium was found between C-105T and C-14T SNPs in both NL and HC groups ($D'=1.00$). Haplotype analysis between C-14T and C-105T SNPs showed that in the HC group, -14CT+TT/-105CT+TT haplotype carriers had higher HDL-c level ($p=0.017$), lower serum triglyceride ($p=0.006$) and VLDL-c ($p=0.005$) and lower TG/HDL-c ratio ($p=0.002$) than those carrying other haplotypes (Table 6). But, as there are few -105CT/TT genotype carriers in our study, other studies are necessary to confirm these results.

Data from univariate logistic regression analysis showed that the *ABCA1* SNPs or haplotypes were not associated with hypercholesterolemia in this study ($p>0.05$, data not shown).

The effects of *ABCA1* SNPs on serum lipid profile were also evaluated in response to atorvastatin (10 mg/day/4 weeks). After the therapy, R219K and C-105T SNPs continued to show an association with a less atherogenic serum lipid profile (Fig. 2), but no *ABCA1* SNP was associated with percentual variations in serum lipids after the treatment (data not shown).

4. Discussion

In the present study, the frequency of the *ABCA1* 219K allele (NL, 40.6%; HC, 42.0%) was similar ($p>0.05$) to that found in

Table 6
Serum levels of lipids according to the *ABCA1* C-105T and C-14T haplotypes in NL and HC patients

Variables	NL haplotypes (143)				HC haplotypes (224)			
	-14CC/ -105CC (60)	-14CT+TT/ -105CC (79)	-14CT+TT/ -105CT+TT (4)	<i>p</i>	-14CC/ -105CC (97)	-14CT+TT/ -105CC (119)	-14CT+TT/ -105CT+TT (8)	<i>p</i>
Total cholesterol (mmol/l)	4.46±0.40	4.48±0.52	4.88±0.28	0.254	6.69±1.29	6.64±1.16	6.37±0.86	0.836
LDL-c (mmol/l)	2.51±0.42	2.60±0.49	2.88±0.25	0.265	4.44±1.17	4.40±1.10	4.05±0.71	0.763
HDL-c (mmol/l)	1.52±0.35	1.45±0.33	1.51±0.30	0.496	1.51±0.41 ^b	1.43±0.35 ^b	1.82±0.32 ^a	0.017
VLDL-c (mmol/l)	0.43±0.15	0.43±0.15	0.49±0.17	0.662	0.74±0.36 ^b	0.80±0.31 ^b	0.49±0.10 ^a	0.005
Triglyceride (mmol/l)	0.94±0.32	0.94±0.32	1.08±0.37	0.662	1.62±0.79 ^b	1.75±0.69 ^b	1.08±0.22 ^a	0.006
ApoAI (g/l)	1.45±0.30	1.40±0.27	1.48±0.21	0.553	1.40±0.32	1.36±0.27	1.56±0.25	0.177
ApoB (g/l)	0.81±0.20	0.89±0.24	0.87±0.10	0.181	1.30±0.33	1.31±0.27	1.24±0.31	0.749
ApoB/apoAI	0.59±0.20	0.66±0.23	0.60±0.16	0.176	0.98±0.32	1.02±0.39	0.80±0.14	0.245
TG/HDL-c	0.67±0.36	0.69±0.33	0.78±0.48	0.744	1.23±0.85 ^b	1.36±0.77 ^b	0.60±0.16 ^a	0.002

Number of individuals in parenthesis. Values are presented as mean±SD of log transformed data. Results were compared by ANOVA one-way and Tukey's test for multiple comparisons. ^{a,b}Different letters in the same line denote significantly different averages.

ApoAI, apolipoprotein AI; apoB, apolipoprotein B; HC, hypercholesterolemic patients; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; NL, normolipidemic patients; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol.

Fig. 2. Effects of the *ABCA1* polymorphisms on serum lipids in the HC group ($n=141$) before and after treatment with atorvastatin. A) R219K SNP. B) C-105T SNP. HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; VLDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol. * $p<0.05$.

Caucasian, Hispanic or Chinese descent Americans (28.0–40.0%) [18], Turks (38.5%) [41] and Pakistanis (37.3%) [26]. However, the frequencies found in our study were higher ($p<0.05$) than those found in a European population with CAD (21.0% and 25.4%) [21,22] and in white Americans (26.2%) [42], but were lower ($p<0.05$) than in black Americans (59.5% and 64.0%) [18,42]. It is noteworthy that the rare allele R219K SNP showed a relationship with lower TG/HDL-c ratio, an indirect measurement of small dense LDL particles [37], that has an important role in the atherosclerotic process [43]. Our findings suggest that the R219K SNP was associated with a reduced risk for CAD in this sample population. Previous studies based on case-control models have shown that the 219K allele seems to modify CAD risk regardless of important modification of plasma lipids [19,20,22].

In this study *ABCA1* R219K SNP was associated with an increased serum apoA1 in the NL group and with a reduced serum triglyceride and VLDL-c in HC individuals. Similar results were found in European population and in Japanese children [21,25]. The putative antiatherogenic effect of the 219K allele is not completely understood. It has been proposed that the substitution of an arginine by a lysine at residue 219 may alter the conformation of the extracellular domain of the *ABCA1* protein enhancing its interaction with apoA1 and increasing the efficiency of phospholipid and cholesterol transfer from intracellular stores to the plasma membrane [18].

Regarding *ABCA1* C-14T SNP, the -14T allele frequencies in HC (35.0%) and NL (33.6%) groups were similar ($p>0.05$) to that found in a random U.S. population (38.0%) [44], a random

Turkish population (37.7%) [41], and in a population of Malay, Indian and Chinese men in Singapore either healthy or with CAD (31.7 to 44.3%) [45], but higher ($p<0.05$) compared to that observed in Dutch men with CAD (13.8%) [27]. We found no significant relationship between C-14T polymorphism and risk for CAD in our population. However, this particular SNP was associated with risk for CAD in an Indian case-control study [45] and increased number of coronary events atherosclerotic progression in Dutch men with CAD [27]. These differences may be due to the fact that in our study the risk for CAD was estimated in individuals without cardiac disease, while the other studies were performed in individuals with CAD.

In addition, we found no association between the *ABCA1* C-14T polymorphism and serum lipids in our population. Similar results were reported in men from Asian and European populations with or without CAD [27,45]. However, an association between -14T allele and increased serum HDL-c has been shown in Turkish and healthy Chinese men [41,45].

The rare allele of the novel C-105T SNP of *ABCA1* was found in low frequencies in both HC (2.0%) and NL (1.4%) groups. Low frequencies and size of the sample may have contributed to the deviations of the C-105T genotype distribution from HWE found in our study. It is possible that other variables such as admixture and selection bias of patients also influenced genotype distributions as well [46]. Therefore, studies carried out with larger samples are necessary to confirm our results.

The C-105T SNP, like R219K also appears to be related to a less atherogenic lipid profile since the -105T allele was

associated with lower triglyceride and VLDL-c and higher HDL-c levels and reduced small LDL (given by the TG/HDL-c ratio) [37] in the HC group. However, these data need to be reevaluated in studies with more individuals.

The mechanism underlying the changes caused by this polymorphism is still unclear. It has been noted that variations in the promoter regions of genes may potentially alter gene expression by changing the affinity or specificity of transcription factor binding to DNA and/or by altering the kinetics of transcription initiation [47]. Several transcription initiation sites have been identified for *ABCA1*, and levels of groups of these transcripts have been characterized [48]. According to the starting sites described by Pullinger et al. [44] or by Schwartz et al. [49], the C-105T SNP is located near a TATA box region. Moreover, this SNP is also located between the SP1 and AP1 motifs in the human *ABCA1* promoter [39,44,50]. Langmann et al. [51] investigated the functional properties of the conserved GnC motif that bind the zinc finger protein Sp1 within the core promoter sequence. These authors have shown that the TATA box and the GnC motif (located next to the C-105T SNP) are pivotal elements for the basal transcriptional activation of *ABCA1* in macrophage and liver cells. Moreover, overexpression of SP1 upregulated *ABCA1* mRNA expression in HeLa cells and enhanced cellular cholesterol and phospholipid efflux in RAW 246.7 macrophages.

The importance of SNPs in modifying gene expression has been demonstrated by several previous studies [52,53]. Then, it is possible that the -105C>T transition in the *ABCA1* promoter modifies the mRNA expression. It could lead to changes in the cellular phospholipid and cholesterol efflux and in the HDL metabolism, that consequently would lead to alteration of the triglyceride metabolism. The negative correlation between plasma HDL-c and fasting triglyceride levels is well known [54], however the precise mechanism regulating this correlation is yet poorly understood. It may result from an exchange in cholesterol and triglyceride between HDL and triglyceride-rich lipoproteins mediated by the cholesterol ester transfer protein (CETP) [21].

In Brazilian individuals we studied only three SNPs and we observed a linkage disequilibrium between C-14T SNP and the novel variant C-105T. In a European population the *ABCA1* C-14T SNP was in linkage disequilibrium with other polymorphisms [23] and in a Turkish population, the -14TT genotype in combination with the 219KK genotype was associated with higher serum HDL-c levels [41]. Therefore, the interpretation of our findings should take in consideration possible interactions with other polymorphisms or even with environmental factors.

Several genetic polymorphisms that may play a role in the different responses to the lipid-lowering therapy have been described. *ABCA1* polymorphisms seem to have a minor impact in this response compared with SNPs in other genes involved in cholesterol metabolism, i.e., *LDLR*, *APOE*, *APOB* [55]. In our study, the HDL-c response to atorvastatin was independent of the *ABCA1* C-105T, C-14T or R219K SNP. Likewise, in Dutch men treated with pravastatin there was no association between progression of atherosclerosis and C-14T SNP [27]. The authors suggested that pravastatin therapy may be able to

overcome the effects of this variant in Dutch population. On the other hand, Lutucuta et al. [56] found a significant association between the *ABCA1* C-477T variant and differences on serum apoA1 but not on other lipids with fluvastatin treatment.

In summary, C-105T SNP, a novel *ABCA1* variant, is linked to the C-14T SNP. In addition, R219K and, possibly, C-105T polymorphisms are associated with a less atherogenic serum lipid profile in Brazilian hypercholesterolemic patients before and after treatment with atorvastatin.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from FAPESP (Project 2003/02086-8). We thank Dr. Sonia Q. Doi (USUHS/USA), for English revision and useful comments. We also thank Helder H. Basques, Veronica S. Oliveira, Nadia Preto Godoy and Claudia Villazon for helping with the patient selection. F.D.V. Genvigir, M.A.V. Willrich, and S.A. Soares were recipients of fellowships from CAPES, CNPq and FAPESP, respectively. S.S. Azaiz and R. Oliveira are recipients of fellowships from FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil; M.H. Hirata and R.D.C. Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brasilia, DF, Brazil.

References

- [1] Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124(Suppl1):S11–20.
- [2] Frick MH, Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, Tenkanen L, Manttari M. HDL-cholesterol as a risk factor in coronary heart disease. An update of the Helsinki Heart Study. *Drugs* 1990;40(Suppl1):7–12.
- [3] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8–15.
- [4] Hersberger M, von Eckardstein A. Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 2003;63:1907–45.
- [5] Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115:1333–42.
- [6] Francome OL, Subbiah PV, van Tol A, Royer L, Haghighat M. Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking Abca1. *Biochemistry* 2003;42:8569–78.
- [7] Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Palomer X, Ribas V, Blanco-Vaca F, Escolá-Gil JC. Direct evidence in vivo of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1738:6–9.
- [8] Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2005;85:1343–72.
- [9] Lee JY, Parks JS. ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:19–25.
- [10] Krimbou L, Marcil M, Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:258–67.
- [11] Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2150–60.
- [12] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999;22:347–51.
- [13] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22:336–45.

- [14] Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM, et al. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 1999;354: 1341–6.
- [15] Rust S, Rosier M, Funke H, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22: 352–5.
- [16] Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 2006;26:105–29.
- [17] Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1322–32.
- [18] Benton JL, Ding J, Tsai MY, et al. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007;193: 352–60.
- [19] Bertolini S, Pisciotta L, Di Scala L, et al. Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;174:57–65.
- [20] Cenarro A, Artieda M, Castillo S, et al. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *J Med Genet* 2003;40:163–8.
- [21] Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:1198–205.
- [22] Evans D, Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidaemia. *J Mol Med* 2003;81:264–70.
- [23] Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, et al. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:775–81.
- [24] Mantaring M, Rhyne J, Ho Hong S, Miller M. Genotypic variation in ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) as contributors to the high and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) phenotype. *Transl Res* 2007;149:205–10.
- [25] Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu Y, Endo K, Arinami T, Hamaguchi H. Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein A1 levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. *Metabolism* 2004;53:182–6.
- [26] Saleheen D, Khanum S, Haider SR, et al. A novel haplotype in ABCA1 gene affects plasma HDL-C concentration. *Int J Cardiol* 2007;115:7–13.
- [27] Zwarts KY, Clee SM, Zwinderman AH, et al. ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. *Clin Genet* 2002;61:115–25.
- [28] Chong PH, Kezele R, Franklin C. High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins. *Circ J* 2002;66:1037–44.
- [29] Ballantyne CM, Herd JA, Fertic LL, et al. Influence of low HDL on progression of coronary artery disease and response to fluvastatin therapy. *Circulation* 1999;99:736–43.
- [30] Naria Y, Kitazoe Y, Kurihara Y, et al. Increase or decrease of HDL-cholesterol concentrations during pravastatin treatment depending on the pre-treatment HDL cholesterol levels. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;52:461–3.
- [31] Grundy SM. United States Cholesterol Guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. *Am J Cardiol* 2001;88: 23J–7J.
- [32] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000;894:1–253.
- [33] Arterial Hypertension Work Groups. IV Brazilian guidelines in arterial hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2004;82(Suppl4):7–22.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Thompson A, Danesh J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. *J Intern Med* 2006;259:481–92.
- [37] Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:186–91.
- [38] 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;44:1748–50.
- [39] Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, et al. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7987–92.
- [40] Yoo J, Seo B, Kim Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33: W483–8.
- [41] Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Common polymorphisms of ATP binding cassette transporter A1, including a functional promoter polymorphism, associated with plasma high density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Atherosclerosis* 2005;183:199–212.
- [42] Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. *The Bogalusa heart study Metabolism* 2003;52:930–4.
- [43] Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:412–7.
- [44] Pullinger CR, Hakamata H, Duchateau PN, et al. Analysis of hABCA1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:451–5.
- [45] Tan JH, Low PS, Tan YS, et al. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum Genet* 2003;113:106–17.
- [46] Zou GY, Donner A. The merits of testing Hardy–Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann Hum Genet* 2006;70:923–33.
- [47] Kim JY, Moon SM, Ryu HJ, et al. Identification of regulatory polymorphisms in the TNF–TNF receptor superfamily. *Immunogenetics* 2005;57: 297–303.
- [48] Huuskonen J, Abedin M, Vishnu M, et al. Dynamic regulation of alternative ATP-binding cassette transporter A1 transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:463–8.
- [49] Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:794–802.
- [50] Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275:28240–5.
- [51] Langmann T, Porsch-Ozcurumez M, Heimerl S, et al. Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. *J Biol Chem* 2002;277:14443–50.
- [52] Cowles CR, Hirschhorn JN, Altshuler D, Lander ES. Detection of regulatory variation in mouse genes. *Nat Genet* 2002;32:432–7.
- [53] Rockman MV, Wray GA. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol* 2002;19(11):1991–2004.
- [54] Despres JP, Lemieux I, Dagenais GR, Cantin B, Lamarche B. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 2000;153:263–72.
- [55] Kajinami K, Takekoshi N, Brousseau ME, Schaefer EJ. Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. *Atherosclerosis* 2004;177:219–34.
- [56] Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto Jr AM, Marian AJ. Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 2001;88:969–73.

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

Maria Alice V. Willich^{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 pseudoexon 3B). This insertion causes a frameshift and may involve subsequent deletions or insertions of 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, mariaalicewillich@yahoo.com.br (M.A.V. Willich).

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: Willich 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

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'-CTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTC-TCA-3' 5'-CCAGGAAGCCAGACTTTGAT-3'	30	58	200
A6986G (CYP3A5*3C) rs776746	PCR sequencing	5'-TTGTGAGGACTTGATGATTACC-3' 5'-CCAGGAAGCCAGACTTTGAT-3'	35	60	370
G14690A (CYP3A5*6) rs not available	PCR-RFLP	5'-GTGGGTTTCTTGTGTCATGT-3'- 5'-GC**GAAACCAATTTTATGA ACT-3'	30	60	204
G14690A (CYP3A5*6) rs not available	PCR sequencing	5'-GTGGGTTTCTTGTGTCATGT-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 Thermo 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

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.

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	0.049 ^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
ApoA1	Baseline	129 ± 29	131 ± 25	NS ^a	129 ± 29	132 ± 25	NS ^a	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 ^a	2.8 ± 14.0	−0.1 ± 11.6	NS ^a
ApoB	Baseline	141 ± 21	137 ± 26	NS ^a	142 ± 21	137 ± 27	NS ^a	142 ± 21	141 ± 23	NS ^a
	Atorvastatin	102 ± 20	94 ± 22	NS ^a	102 ± 19	95 ± 22	NS ^a	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 ^a	−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 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.

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

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	121.6±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	0.246 ^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	0.566 ^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/*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 P-gP, 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 (84.8%) 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].

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.

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 a multitude of complex processes in which 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, Brasilia, 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. 1981. *Atheroscler Suppl* 2004;5:57–9.
- [3] Stein EA. Managing dyslipidemia in the high-risk patient. *Am J Cardiol* 2002;89:50C–7C.
- [4] Belloc S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins. *Circulation* 2004;109:53:50–7.
- [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, daSilveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, 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] Gervasi G, Vizcaino S, Gasiba 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;44:1748–50.
- [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 IP, 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, Shibuski 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, Pinto A, Hall SD, Flockhart DA, Li L, Skaar 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>.