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

**Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na modulação
de biomarcadores de inflamação e adesão celular *in vivo* e *in vitro***

Alvaro Cerda Maureira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2013

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

**Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na modulação
de biomarcadores de inflamação e adesão celular *in vivo* e *in vitro***

Alvaro Cerda Maureira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2013

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

C413p Cerda Maureira, Alvaro Danilo
Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na
modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular
in vivo e *in vitro* / Alvaro Danilo Cerda Maureira. -- São
Paulo, 2013.
181p.

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

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Lipídeo : Bioquímica clínica 2. Hipercolesterolemia
3. Inflamação I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, orientador.

616.0756 CDD

Alvaro Cerda Maureira

Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na modulação de biomarcadores de inflamação e adesão celular *in vivo* e *in vitro*

Comissão Julgadora

da

Tese para obter o grau de Doutor

Profa. Dra. Rosario Domingues Crespo Hirata

Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, __ de _____ de 2013

À Mónica e Gabriela....

Vocês são todas minhas razões.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio constante durante todos esses anos longe da família e amigos. Obrigado por terem acreditado e me apoiado em todos meus desafios pessoais e profissionais.

À minha orientadora, professora Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo apoio e dedicação. Obrigado por me ensinar, com o exemplo, que com dedicação e perseverança todos os objetivos são alcançáveis. Pela amizade, por me ajudar a crescer pessoal e cientificamente, minha mais sincera gratidão.

Ao professor Mario Hiriyuki Hirata, pela ajuda e conselhos desinteressados. Obrigado por todas as conversas que incentivam à busca de novos desafios.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu diretor, Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao programa *BECAS-CHILE* do *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT-Chile)*, pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido para a execução dessa pesquisa.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Sandra Helena Farsky.

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

À Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em nome do Dr. Egídio Lima Dorea, Dra. Maria Cecília Gusukuma e Dra. Gelba Almeida Pinto, pela colaboração na seleção e acompanhamento dos pacientes participantes deste trabalho.

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

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

Aos voluntários pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, que contribuíram de maneira anônima e desinteressada para a execução deste trabalho.

À Cristina Moreno Fajardo, Técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Por seu grande profissionalismo, pelo apoio na execução de diversas etapas deste trabalho. Pela amizade e companhia ao longo dos últimos anos.

Aos alunos de iniciação científica, Camila Alves e Rodrigo Gouveia.

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

À comunidade “chileno-uspiana”, pela companhia e amizade ao longo desses anos. Por sempre trazer de volta um pouquinho da nossa terra para matar a saudade.

Aos meus amigos Carlos e Lara. Por fazer da sua casa a nossa casa. Pelo carinho, pela amizade, pelo samba.

*“Há homens que lutam um dia e são bons,
há outros que lutam um ano e são melhores,
há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Mas há os que lutam toda a vida, esses são imprescindíveis”*

Bertolt Brecht

RESUMO

CERDA A. **Papel de inibidores da síntese e da absorção do colesterol na modulação de biomarcadores de inflamação e adesão celular *in vivo* e *in vitro***. 2013. 181p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O processo inflamatório tem um papel fundamental na gênese e desenvolvimento da aterosclerose, sendo que a disfunção endotelial é considerada um dos estágios iniciais da aterogênese. Por meio da inibição da enzima hidroximetil-glutaril coA redutase (HMGCR), as estatinas reduzem a biossíntese do colesterol e a formação de isoprenóides, produtos intermediários da síntese do colesterol que são importantes na modificação pós-transcricional de GTPases pequenas que estão envolvidas na disfunção endotelial e inflamação vascular. A ezetimiba é um inibidor da absorção do colesterol através da inibição da proteína NPC1L1. Com a finalidade de esclarecer os mecanismos moleculares da inibição da síntese e da absorção do colesterol sobre a modulação de biomarcadores inflamatórios e de adesão celular foram utilizados modelos *in vitro* com células endoteliais (HUVEC) e monócitos (células THP-1), e *in vivo* com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos hipercolesterolêmicos (HC). O efeito das estatinas, atorvastatina e sinvastatina, e da ezetimiba na expressão de RNAm e proteínas de moléculas de adesão endoteliais e moduladores do processo inflamatório, como citocinas e óxido nítrico (NO), foi estudado em células HUVEC. O efeito desses fármacos sobre a expressão de moléculas de adesão monocitárias foi estudado em células THP-1. O efeito da terapia hipolipemiante sobre essas moléculas foi também estudada em CMSP de HC tratados com ezetimiba (10 mg/dia/4 semanas), sinvastatina (10 mg/dia/8 semanas) e sinvastatina combinada com ezetimiba (10 mg de cada/dia/4 semanas). A expressão de RNAm foi avaliada por RT-qPCR. A expressão de moléculas de adesão na superfície de células THP-1 e HUVEC foi estudada por citometria de fluxo. A quantificação de citocinas secretadas no sobrenadante de células HUVEC e no plasma dos HC foi analisada pela tecnologia *Milliplex*. A quantificação do perfil lipídico, Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus) e NO foi realizada por métodos laboratoriais convencionais. O papel do NO na modulação dos marcadores inflamatórios pelas estatinas foi também estudada, usando modelo de células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm e também por meio do uso do inibidor da síntese do óxido nítrico, L-NAME. Também foi avaliado o efeito de hipolipemiantes na expressão dos microRNAs (miRs) 221, miR-222 e miR-1303 em células HUVEC por meio do stem-loop RT-qPCR. O tratamento com atorvastatina e sinvastatina reduziu a expressão de RNAm e proteínas das moléculas de adesão L-Selectina, PSGL-1 e VLA-4, em células THP-1 pré-tratadas com TNF α por 12 h. A ezetimiba reduziu a expressão de L-Selectina apenas no nível transcricional. Em células HUVEC, as estatinas diminuíram a expressão de RNAm de *IL1B* e *SELP*, entretanto aumentaram a de *VCAM1*. A ezetimiba reduziu a expressão de RNAm do *IL1B*. Entretanto as expressões de *SELE*, *MMP9*, *IL6* e *MMP9* não foram afetadas pelos tratamentos. A expressão das proteínas ICAM-1 e P-Selectina, na superfície de células HUVEC, foi diminuída pelo tratamento com as estatinas, mas não pela ezetimiba. Da mesma forma, a secreção das citocinas IL-6 e MCP-1 foram reduzidas pelas estatinas,

entretanto a secreção de IL-8 não foi modificada por nenhum dos tratamentos. A expressão de *NOS3* e a liberação de NO em células HUVEC foi aumentada pelas estatinas, porém não foi estimulada pela ezetimiba. Entretanto, os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelas estatinas foram independentes dessa via devido a que estes efeitos foram mantidos em células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm. Apesar de que o efeito sobre ICAM-1 e MCP-1 foi atenuado quando as células foram simultaneamente tratadas com L-NAME, os efeitos das estatinas parecem ser independentes da liberação de NO. As estatinas e a ezetimiba reduziram a expressão do miR-221, em células HUVEC. A expressão do miR-222 foi reduzida só pelo tratamento com atorvastatina. A expressão do miR-1303 não foi modulada pelos tratamentos hipolipemiantes. Em pacientes HC, a terapia de associação da sinvastatina e ezetimiba demonstrou melhorar o perfil lipídico de forma mais efetiva que ambas monoterapias. Da mesma forma, o tratamento combinado resultou em maior benefício pela redução da expressão de RNAm em CMSP e da concentração plasmática das proteínas IL-1 β , MCP-1, IL-8 e TNF α . A expressão de *ICAM1* foi diminuída apenas no nível transcricional, entretanto a expressão de RNAm mas não da proteína do TNF α foi também reduzida pela sinvastatina em monoterapia. Não houve modulação de RNAm ou proteínas de outros marcadores estudados no modelo *in vivo*. Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios observados nos indivíduos HC foram independentes da modulação de PCRus e NO que não foram modificados pelos tratamentos hipolipemiantes. Neste estudo, foram confirmados os propostos efeitos pleiotrópicos das estatinas em modelos células de monócito e endotélio vascular *in vitro* e em pacientes HC. Por outro lado, apesar de ser menos potente que as estatinas foi mostrado que a inibição da absorção do colesterol tem também um efeito anti-inflamatório. A redução adicional do colesterol causado pela combinação das terapias hipolipemiantes outorga um maior benefício cardiovascular em pacientes hipercolesterolêmicos.

Palavras-chaves: Hipercolesterolemia; inflamação; moléculas de adesão; terapia hipolipemiante; estatinas; ezetimiba.

ABSTRACT

CERDA A. **Role of inhibitors of the cholesterol synthesis and absorption on modulation of inflammation and cell adhesion biomarkers *in vivo* and *in vitro*.** 2013. 181p. Thesis (PhD degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The inflammatory process has a key role in the genesis and development of atherosclerosis and the endothelial dysfunction is considered as a first step in atherogenesis. By inhibiting the hydroxyl-methyl-glutaryl coA reductase (HMGCR) statins reduce the cholesterol synthesis and isoprenoid generation, which are intermediary products of cholesterol synthesis with important role in post-transcriptional modifications of small GTPases that are involved in endothelial dysfunction and vascular inflammation. The ezetimibe is an inhibitor of cholesterol absorption by inhibiting the NPC1L1 protein. To clarify the molecular mechanisms of the inhibition of cholesterol synthesis and absorption modulating inflammatory and cell adhesion biomarkers we used *in vitro* models of endothelial cells (HUVEC) and monocytes (THP-1), and an *in vivo* model of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from hypercholesterolemic (HC) patients. The effect of the statins, atorvastatin and simvastatin, and the ezetimibe on mRNA and protein expression of endothelial adhesion molecules and modulators of the inflammatory process, as cytokines and nitric oxide (NO), was analyzed in HUVEC. The effect of these drugs on the expression of monocyte adhesion molecules was also studied in THP-1. The influence of hypolipemiant therapy on the adhesion molecules was also analyzed in PBMC from HC treated with ezetimibe (10 mg/day/4-weeks), simvastatin (10 mg/day/8-weeks) and simvastatin combined with ezetimibe (10 mg each/day/4-weeks). The mRNA expression was evaluated by RT-qPCR. The expression of adhesion molecules on the surface of THP-1 and HUVEC cells was analyzed flow cytometry. The cytokines in the supernatants of HUVEC were quantified using the multiplex technology. The Lipid profile, high-sensitivity PCR (hsPCR) and NO were determined by conventional laboratory methods. The role of the NO on the statin-modulation of inflammatory markers was also studied using a model with silenced NOS3 by interference of mRNA and by the use of the inhibitor of NO synthesis, L-NAME. The effect of hypolipemiant on the expression of microRNAs (miRs) 221, miR-222 and miR-1303 was also evaluated in HUVEC using the stem-loop RT-qPCR. Atorvastatin and simvastatin reduced the mRNA and protein expression of the adhesion molecules L-Selectin, PSGL-1 and VLA-4 in THP-1 cells pre-treated with TNF α for 12 h. The ezetimibe reduced the L-Selectin expression only at transcriptional level. In HUVEC, statins diminished *IL1B* and *SELP* mRNA expression, whereas *VCAM1* was increased. The ezetimibe reduced the *IL1B* mRNA expression. However, *SELE*, *MMP9*, *IL6* and *MMP9* mRNA expressions were not affected by the treatments. The protein expression of ICAM-1 and P-Selectin on the surface of HUVEC was reduced by statins, but not by the ezetimibe. Similarly, IL-6 and MCP-1 secretion were reduced by statins, whereas IL-8 secretion was not modified by the treatments. The NO release and *NOS3* expression in HUVEC was increased by the statins, however it was not stimulated by ezetimibe. Moreover, the anti-inflammatory statin effects were independent of this pathway due to statin effects were maintained in HUVEC with silenced *NOS3*. Although the statin effect on ICAM-1 and MCP-1 were attenuated by L-NAME co-

treatment, the statin effects seem to be independent of NO release. Statins and ezetimibe reduced miR221 in HUVEC. miR-222 expression was reduced only by atorvastatin. miR-1303 was not affected by the treatments. In HC patients, the improvement of the lipid profile simvastatin combined with ezetimibe was more efficient than both monotherapies. Similarly, the association therapy was better in reducing the mRNA expression in PBMC and plasma concentration of IL-1 β , MCP-1, IL-8 and TNF α . *ICAM1* expression was reduced only at transcriptional level, whereas mRNA but not protein expression of TNF α was also reduced by the simvastatin monotherapy. There was no modulation mRNA or protein expression of other studied markers in the *in vivo* model. Additionally, the anti-inflammatory effects observed in the HC were independent of PCrUs or NO modulation, which were not altered by the hypolipemiant treatments. In this study, the proposed pleiotropic effects of statins were confirmed in monocytes and endothelial cells *in vitro* and in HC patients. Moreover, although it was less potent than statins, an anti-inflammatory effect was also observed for the inhibition of cholesterol absorption. An additional reduction of the cholesterol caused by combined hypolipemiant therapies gives a greater cardiovascular benefit in hypercholesterolemic patients.

Key-words: Hypercholesterolemia; inflammation; adhesion molecules; hypolipemiant therapy; statins; ezetimibe.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Instauração do processo aterosclerótico.....	25
Figura 2	Mecanismos hipolipemiantes das estatinas e ezetimiba.....	34
Figura 3	Gel e electroforograma de amostra de RNA total extraída de células THP-1 analisada no Bioanalyzer.....	57
Figura 4	Curva de crescimento das células THP-1.....	68
Figura 5	Curva de crescimento das células HUVEC.....	69
Figura 6	Curva de crescimento de células THP-1 tratadas com atorvastatina, sinvastatina e ezetimibe.....	71
Figura 7	Curva de crescimento de células HUVEC tratadas com atorvastatina, sinvastatina e ezetimibe.....	72
Figura 8	Viabilidade celular das células THP-1 após tratamento com atorvastatina.....	73
Figura 9	Viabilidade celular das células THP-1 após tratamento com atorvastatina.....	74
Figura 10	Efeito dos fármacos na integridade de membrana e fragmentação de DNA das células THP-1.....	74
Figura 11	Morfologia de células THP-1 após tratamento com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba.....	75
Figura 12	Efeito dos fármacos na integridade de membrana e fragmentação de DNA das células HUVEC.....	76
Figura 13	Morfologia de células HUVEC após tratamento com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba.....	77
Figura 14	Análise da estabilidade dos genes de referência endógena pelo <i>software</i> Genorm.....	80
Figura 15	Efeito da atorvastatina na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC.....	81
Figura 16	Efeito da sinvastatina na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC.....	82
Figura 17	Efeito da ezetimiba na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC.....	83
Figura 18	Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC.....	84
Figura 19	Efeito da atorvastatina na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC.....	85
Figura 20	Efeito da sinvastatina na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC.....	86
Figura 21	Efeito da ezetimiba na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC.....	86
Figura 22	Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na secreção de citocinas	

	em células HUVEC.....	88
Figura 23	Efeito da atorvastatina. Sinvastatina e ezetimiba na expressão gênica de <i>NOS3</i> em células HUVEC.....	89
Figura 24	Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na liberação de óxido nítrico em células HUVEC.....	89
Figura 25	Avaliação da expressão gênica em células HUVEC transfectadas com siRNA para <i>GAPDH</i> e <i>NOS3</i>	91
Figura 26	Efeito da atorvastatina e sinvastatina na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC com <i>NOS3</i> silenciado por interferência de RNAm.....	92
Figura 27	Efeito da atorvastatina e sinvastatina na secreção de citocinas, em células HUVEC com <i>NOS3</i> silenciado por interferência de RNAm.....	93
Figura 28	Efeito da atorvastatina e sinvastatina na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC co-tratadas com L-NAME.....	94
Figura 29	Efeito da atorvastatina e sinvastatina na secreção de citocinas em células HUVEC co-tratadas com L-NAME.....	96
Figura 30	Análise da estabilidade dos RNAs de referência endógena pelo <i>software</i> Genorm.....	97
Figura 31	Efeito da atorvastatina, sinvastatin e ezetimiba na expressão de miR-221, miR-222 e miR-1303 em células HUVEC.....	98
Figura 32	Efeito da atorvastatina na expressão gênica em células THP-1.....	99
Figura 33	Efeito da sinvastatina na expressão gênica em células THP-1.....	100
Figura 34	Efeito da ezetimiba na expressão gênica em células THP-1.....	100
Figura 35	Efeito da atorvastatina na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1.....	101
Figura 36	Efeito da sinvastatina na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1.....	102
Figura 37	Efeito da ezetimiba na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1.....	102
Figura 38	Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moléculas de adesão endoteliais em CMSP de hipercolesterolêmicos.....	106
Figura 39	Efeito de hipolipemiantes na concentração plasmática de formas solúveis de moléculas de adesão em hipercolesterolêmicos.....	107
Figura 40	Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moduladores do processo inflamatório em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos.....	108
Figura 41	Efeito de hipolipemiantes na concentração plasmática de mediadores de inflamação em hipercolesterolêmicos.....	109
Figura 42	Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moléculas de adesão monocitárias em indivíduos hipercolesterolêmicos.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>SELP</i> , <i>SELE</i> e <i>NOS3</i>	59
Tabela 2	Sequência de iniciadores e sonda utilizados para os de qPCR dos genes endógenos.....	61
Tabela 3	Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	62
Tabela 4	Sequência dos siRNA utilizados nos ensaios de silenciamento gênico do <i>NOS3</i>	64
Tabela 5	Eficiência ensaios utilizados nas reações de qPCR.....	78
Tabela 6	Características clínicas e demográficas da população estudada.....	104
Tabela 7	Parâmetros bioquímicos em indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após cada fase do protocolo terapêutico.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	<i>ATP binding cassette A1</i>
ABCG1	<i>ATP binding cassette G1</i>
ALT	Alanina aminotransferase
apoAI	Apolipoproteína AI
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
<i>APOE</i>	Gene Apolipoproteína E
<i>B2M</i>	Gene da beta-2-microglobulina
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CK	Creatino quinase
Ct	Ciclo de <i>threshol</i> d
DAC	Doença arterial coronariana
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucléico
sE-Selectina	Forma solúvel da E-Selectina
FPP	Farnesil-pirofosfato
FMD	dilatação mediada pelo fluxo
<i>GAPDH</i>	Gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GGPP	Geranylgeranyl-pirofosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
GTP	Trifosfato de guanosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
<i>HMBS</i>	Gene da hidroximetil-bilano sintase
HMGCR	β -hidroxi- β -metil-glutaril Coenzima A redutase
<i>HPRT1</i>	Gene da hipoxantinafosforibosil-transferase I
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
sICAM-1	Forma solúvel da Molécula de Adesão Intercelular 1
<i>ICAM1</i>	Gene da molécula de Adesão Intercelular 1

ICC	insuficiência cardíaca crônica
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-1 β	Interleucina 1 beta
<i>IL1B</i>	Gene da interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
<i>IL6</i>	Gene da interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
<i>IL8</i>	Gene da interleucina 8
<i>ITGA4</i>	Gene da integrina $\alpha 4\beta 1$
<i>ITGAL</i>	Gene da integrina $\alpha L\beta 2$
<i>ITGAM</i>	Gene da integrina $\alpha M\beta 2$
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LFA-1	Integrina $\alpha L\beta 2$
L-NAME	L-NG-Nitroarginina Metil Ester
LPS	Lipopolissacarídeo
LXR	Receptor X hepático
Mac-1	Integrina $\alpha M\beta 2$
MCP-1	Proteína Quimiotática dos Monócitos 1
<i>MCP1</i>	Gene da Proteína Quimiotática dos Monócitos 1
miR	MicroRNA
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
<i>MMP9</i>	Gene da metaloproteinase de matriz 9
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
<i>NFKB</i>	Gene do Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
nNOS	Oxido nítrico sintase neuronal
<i>NOS3</i>	Gene da óxido nítrico sintase endotelial
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1 like 1</i>
p38MAPK	Proteína kinase p38 mitogeno-ativada

PBS	Tampão salina fosfato
PCRus	Proteína C reativa ultra-sensível
PDT	Tempo de dobramento das populações celulares
PI	Iodeto de propídeo
PKB/akt	Proteína quinase B
PMA	Aceto miristato de forbol
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PSGL-1	Glicoproteína ligadora de P-Selectina
RIP140	<i>Receptor-interacting protein 140</i>
RLDL	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
RNA	Acido ribonucléico
RNA _m	Acido ribonucléico mensageiro
siRNA	RNA pequeno de interferência
SCAP	<i>SREBF cleavage activating protein</i>
SDHA	<i>Gene do complexo da succinatodesidrogenase, subunidade A</i>
SELE	Gene da E-Selectina
SELL	Gene da L-Selectina
SELP	Gene da P-Selectina
SELPLG	Gene da glicoproteína ligadora de P-Selectina
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
SREBF	<i>Sterol responsive element binding factor</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNFA	Gene do Fator de Necrose Tumoral alfa
TRC	Transporte reverso do colesterol
UBC	Gene da ubiquitina C
UTR	Região transcrita não traduzida
VCAM-1	Molécula de Adesão Endotelial Vascular 1
sVCAM-1	Forma solúvel da Molécula de Adesão Endotelial Vascular 1
VCAM1	Gene da Molécula de Adesão Endotelial Vascular 1
VLA-4	integrina $\alpha 4\beta 1$
VLDL	Lipoprtteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	47
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1. Seleção dos participantes de estudo.....	49
3.2. Protocolo terapêutico.....	50
3.3. Amostras biológicas.....	51
3.4. Determinações laboratoriais.....	51
3.5. Linhagens Celulares e Condições de Cultivo e tratamentos.....	53
3.6. Curva de Crescimento e Tempo de Dobramento das Populações Celulares.....	54
3.7. Efeito dos fármacos na viabilidade celular e fragmentação do DNA.....	55
3.8. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico para extração de RNA total.....	56
3.9. Isolamento e avaliação do RNA total de CMSP, células HUVEC e THP-1.....	56
3.10. Análise da expressão gênica por qRT-PCR em tempo real.....	58
3.11. Análise da expressão protéica por citometria de fluxo.....	62
3.12. Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito de hipolipemiantes em células HUVEC.....	63
3.13. Análise dos micro-RNAs.....	65
3.14. Análise estatística.....	66
4. ASPECTOS ÉTICOS.....	67
5. RESULTADOS	68
5.1. Análise de citotoxicidade dos fármacos nas populações celulares.....	68
5.2. Validação dos ensaios de qPCR.....	77
5.3. Efeito de hipolipemiantes sobre as moléculas de adesão em células HUVEC.....	81
5.4. Efeito de hipolipemiantes sobre os mediadores de inflamação em células HUVEC.....	85

5.5. Efeito de hipolipemiantes na expressão de <i>NOS3</i> e liberação de óxido nítrico em células HUVEC.....	88
5.6. Papel do óxido nítrico no efeito das estatinas em células HUVEC.....	90
5.7. Efeitos de hipolipemiantes na expressão de micro-RNAs em células HUVEC.....	96
5.8. Efeito de hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão em células THP-1..	98
5.9. Efeito de hipolipemiantes na modulação de marcadores de adesão celular e marcadores inflamatórios <i>in vivo</i>	103
6. DISCUSSÃO.....	111
7. CONCLUSÕES.....	133
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	135
9. ANEXOS.....	160

1. INTRODUÇÃO

A Aterosclerose. Epidemiologia e fisiopatologia.

A aterosclerose é uma das principais causas de doença cardiovascular, que ainda tem alta prevalência no mundo. De acordo com a *World Heart Federation* as doenças cardiovasculares são responsáveis pela morte de 17,3 milhões de pessoas cada ano no mundo representando aproximadamente um 30% do total das causas. No Brasil, houve 326371 óbitos por doenças do aparelho circulatório (28,7% do total de causas), no período mais recentemente publicado (2010), principalmente as doenças cerebrovasculares, a doença isquêmica do coração e infarto agudo do miocárdio (fonte: DATASUS- Ministério da Saúde, Brasil).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas – lipoproteínas de baixa densidade (LDL), de densidade intermediária (IDL), de densidade muito baixa (VLDL), e remanescentes de quilomícrons –, hipertensão arterial, obesidade, hiperglicemia ou tabagismo (Bui, Prempeh *et al.*, 2009). Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (Sposito, Caramelli *et al.*, 2007). Por outro lado, as

lipoproteínas presentes na íntima são sujeitas a modificações químicas, como a oxidação. A LDL oxidada é caracterizada por favorecer o processo aterosclerótico através do incremento do conteúdo lipídico e a perda da integridade do endotélio vascular pela formação de produtos citotóxicos (Stocker e Keaney, 2004).

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o aumento da expressão de moléculas de adesão de leucócitos na superfície das células endoteliais (**Figura 1**). As moléculas de adesão são responsáveis pela interação de monócitos e linfócitos com a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam partículas de LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídios são denominados células espumosas que são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Milioti, Bermudez-Fajardo *et al.*, 2008).

Uma molécula de adesão que medeia a interação entre leucócitos e endotélio e tem surgido como um forte candidato para explicar a adesão prematura dos monócitos à superfície das células endoteliais é a Molécula de Adesão Endotelial Vascular 1 (VCAM-1, **Figura 1**). Foi observado que a expressão de VCAM-1 está aumentada no ateroma nascente na artéria aorta de coelhos e, quando estes animais são submetidos a uma dieta aterogênica, a expressão de VCAM-1 precede o surgimento de macrófagos na camada íntima das artérias e as lesões aparecem depois de três semanas (Li, Cybulsky *et al.*, 1993). Por outro lado, camundongos geneticamente modificados para expressar uma VCAM-1 defeituosa mostraram uma lesão aterosclerótica atenuada (Cybulsky, Iiyama *et al.*, 2001).

Figura 1. Instauração do processo aterosclerótico. O endotélio ativado libera citocinas e quimiocinas que atraem os monócitos ao sítio da lesão. Através das moléculas de adesão PSGL-1 e L-Selectina, os monócitos interagem com E- e P-Selectina e PSGL-1 endoteliais mediando o *rolling*. A indução da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio permite a adesão estável dos monócitos através da interação com VLA-4, LFA-1 e Mac-1. Os monócitos migram para a camada íntima da artéria onde diferenciam em macrófagos que, pela captura de LDLox, podem dar origem às células espumosas, com alto conteúdo lipídico, características do ateroma. M, monócito; E, endotélio; LDLox, LDL oxidada; IL, interleucina; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos 1; TNF α , fator de necrose tumoral alfa; PSGL-1, glicoproteína ligadora de P-selectina; VLA-4, integrina $\alpha 4\beta 1$; LFA-1, integrina $\alpha L\beta 2$; Mac-1, integrina $\alpha M\beta 2$. Modificado de (Libby, Dicarli *et al.*, 2010)

Outras moléculas expressas pelas células endoteliais envolvidas na adesão ao endotélio para o posterior recrutamento dos leucócitos para a formação de placas ateroscleróticas são a Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1), E-Selectina e P-Selectina (Ley, Laudanna *et al.*, 2007). As duas últimas pertencentes à família de

moléculas de adesão das selectinas que têm sido relacionadas com a aterosclerose, sendo que a deficiência combinada de ambas – P e E-selectina – inibiu de forma significativa o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos, mostrando uma proteção de 80% e 40% no estágio precoce e tardio da doença, respectivamente (Dong, Chapman *et al.*, 1998). Por outro lado, enquanto VCAM-1 é uma molécula principalmente induzível, ICAM-1 é também expressa em células endoteliais de forma constitutiva, mas ambas são induzidas por fatores pro-aterogênicos (Fisker Hag, Pedersen *et al.*, 2008).

Além das moléculas de adesão acima mencionadas, as células endoteliais, uma vez ativadas, também iniciam a liberação de várias citocinas, num processo regulado principalmente pela atividade transcricional do Fator Nuclear Kappa B (NFκB) (Collins e Cybulsky, 2001). A interação entre células endoteliais e plaquetas resulta na forte ativação de ambos, refletida pela liberação de potentes substâncias pro-inflamatórias como, por exemplo, a Interleucina (IL) -1β (Otterdal, Smith *et al.*, 2006). A IL-1β é sintetizada e liberada pelas plaquetas e células endoteliais em quantidades significantes e tem sido identificada como um importante mediador da ativação do endotélio vascular, induzindo a secreção da Proteína Quimiotática dos Monócitos 1 (MCP-1) e IL-6, a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e selectinas, e a ativação de NFκB (Gawaz, Brand *et al.*, 2000).

A MCP-1 é uma citocina quimiotática. As citocinas quimiotáticas, também conhecido como quimiocinas, têm funções na regulação do transito de leucócitos, controlando a migração de neutrófilos, linfócitos, células apresentadores de antígenos e monócitos/macrófagos. Em resposta a estímulos inflamatórios na presença de disfunção endotelial, a liberação de MCP-1 pode atrair células inflamatórias de diferentes

linhagens contribuindo para a instauração e agravamento do processo aterosclerótico (Yadav, Saini *et al.*, 2010).

Outra citocina pertencente ao grupo das quimiocinas é a IL-8. No processo aterosclerótico, em respostas a diversos estímulos inflamatórios, a IL-8 é secretada pelas células endoteliais e monócitos/macrófagos, levando ao recrutamento de neutrófilos e monócitos à lesão aterosclerótica (Apostolakis, Vogiatzi *et al.*, 2009)

Além de mecanismos de lesão vascular que favorecem o surgimento de moléculas de adesão no endotélio, outros mecanismos associados a fatores mecânicos como o fluxo sanguíneo ou marcadores pró-inflamatórios têm sido relacionados com a gênese e desenvolvimento da aterosclerose. Há evidências que sugerem que os mecanismos ateroprotetores endógenos são prejudicados em algumas regiões da parede vascular, nas quais o fluxo sanguíneo está alterado (Hahn e Schwartz, 2009).

Uma importante característica da disfunção endotelial é a síntese, liberação e atividade diminuída de óxido nítrico (NO) derivado do endotélio. O NO, uma molécula vasodilatadora endógena, tem um papel central na manutenção da integridade do endotélio vascular e a diminuição da biodisponibilidade desta molécula tem sido relacionada com aumento no risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Li e Forstermann, 2000).

A síntese do NO é mediada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) que apresentam três isoformas - NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) -. Enquanto a nNOS e eNOS são constitutivamente expressas nos neurônios e células endoteliais, a iNOS não é usualmente expressa nas células, podendo responder a diversos estímulos como, por exemplo, citocinas inflamatórias. A eNOS é

particularmente importante para o endotélio vascular pela regulação que NO exerce no tônus vascular, por um mecanismo que envolve a estimulação da guanilil ciclase solúvel e o aumento do GMP cíclico nas células musculares lisas. Além da regulação da musculatura vascular que permite manter condições adequadas de fluxo, o NO tem também outros efeitos que aumentam seu potencial anti-aterogênico, como inibição do recrutamento de células inflamatórias, controle da proliferação de células musculares lisas e estímulo do processo de angiogênese [revisado em (Forstermann e Sessa, 2012)].

Outra molécula vinculada ao processo inflamatório é a Proteína C reativa ultrasensível (PCRus), um marcador de fase aguda de processo inflamatório sistêmico, que se tem mostrado um importante marcador de risco cardiovascular. Produzida pelo fígado em resposta a presença de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, concentrações elevadas de PCRus têm demonstrado ser preditivas de risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em homens e mulheres aparentemente saudáveis (Clearfield, 2005).

Interação dos leucócitos com o endotélio: rolling e adesão estável

O recrutamento dos leucócitos na parede do endotélio ocorre inicialmente por um processo denominado *rolling*, pelo qual leucócitos experimentam uma aproximação e interação inicial com a camada de células endoteliais, seguida por uma adesão firme ao endotélio e posterior migração trans-endotelial (**Figura 1**).

Uma vez que as moléculas de adesão são expressas nas células endoteliais em quantidades suficientes para iniciar o processo de recrutamento, essas moléculas interagem com receptores específicos nos monócitos. O *rolling* inicial é mediado pelas

E-Selectina e P-Selectina expressas na superfície da célula endotelial e a L-Selectina de monócitos, que interagem com a Glicoproteína ligadora de P-selectina 1 (PSGL-1) e outros ligantes (Ley, Laudanna *et al.*, 2007). A PSGL-1 é a principal responsável pelo *rolling* dos monócitos pelo fato de ser expressa em ambas as células, endoteliais e monócitos, e ligar as três selectinas E, P e L (Huo e Xia, 2009). Além disso, o fato de a PSGL-1 ligar a L-selectina expressa nos monócitos medeia a interação monócito-monócito, facilitando assim a captura secundária de leucócitos ou *tethering*, incrementando assim o processo inflamatório no ateroma nascente (Ley, Laudanna *et al.*, 2007).

A diminuição da velocidade do *Rolling* causada pela interação entre as selectinas e a PSGL-1 aumenta o tempo do trânsito dos monócitos no endotélio inflamado, favorecendo a probabilidade deles serem ativados por citocinas quimiotáticas presentes na superfície endotelial (Constantin, Majeed *et al.*, 2000). Durante esse processo, as citocinas quimiotáticas MCP-1 e IL-8, auxiliadas pela interação da PSGL-1 com seus ligantes no endotélio, induzem um rápido aumento na afinidade de ligação e atividade das β -2-integrinas presentes nos leucócitos, que promovem a captura de monócitos via estes fatores quimiotáticos, no endotélio mediante a retenção do *rolling* (Gerszten, Garcia-Zepeda *et al.*, 1999; Papadopolou, Corrigan *et al.*, 2008).

A alta afinidade das citocinas quimiotáticas pelos Receptores Acoplados a Proteínas G (*G-protein- coupled receptor* –GPCR) iniciam a cascata de sinalização intracelular desses receptores para a ativação das vias da fosfolipase C, ativação das pequenas GTPases, e alterações na conformação das integrinas (Lorenowicz, Van Gils *et al.*, 2006).

No monócito, a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) é conhecida por favorecer o processo final da retenção do monócito no endotélio que resulta na adesão estável (Dikeman, Rivera Rosado *et al.*, 2008). A captura dos monócitos é induzida posteriormente pela ligação das integrinas leucocitárias $\alpha L\beta 2$ (LFA-1 ou CD11a) e $\alpha M\beta 2$ (Mac-1 ou CD11b) à ICAM-1 endotelial, e a ligação da própria VLA-4 do monócito à VCAM-1 no endotélio (Ley, Laudanna *et al.*, 2007).

Após o estabelecimento da adesão estável dos monócitos ao endotélio acontece a migração trans-endotelial, pela qual os monócitos podem acessar a camada íntima das artérias passando entre as células endoteliais via diapedese (Libby, Okamoto *et al.*, 2010). Uma vez na camada íntima, os monócitos podem adquirir características morfológicas de macrófagos, os quais sofrem alterações funcionais, como a indução da expressão de *receptores scavenger*, que resultam na formação de células espumosas, facilitando assim a instauração da placa aterosclerótica.

Progressão da placa aterosclerótica

No ateroma nascente, o recrutamento constante de células inflamatórias e o acúmulo de lipídeos levam à formação de um núcleo com alto conteúdo lipídico, coberto por uma capa fibrosa composta principalmente por matriz extracelular e colágeno (Libby, 2006).

A ruptura física da placa aterosclerótica, causada pelo rompimento da capa fibrosa que separa o núcleo lipídico da circulação sanguínea, causa a maioria das síndromes coronárias agudas, resultando na formação de trombos e súbita expansão da lesão.

Quando as condições inflamatórias e fatores de risco observados no processo aterosclerótico como a dislipidemia persistem, essa capa fibrosa pode ser degradada pela ação de proteinases. Dentre elas, a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) tem sido largamente relacionada com a degradação da matriz extracelular que favorece o rompimento da placa aterosclerótica (Johnson, 2007). Estudos *in vitro* têm demonstrado que citocinas pro-inflamatórias encontradas no ateroma, como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), IL-1 β ou IL-6, induzem a expressão de MMP-9 em monócitos e células endoteliais (Zhao e Benveniste, 2008).

O rompimento da placa aterosclerótica leva à exposição do fator tisular presente na placa, colocando-o em contato com o sangue circulante. A ativação da cascata de coagulação leva à ativação das plaquetas que resulta em uma rápida formação do trombo.

O trombo formado pode eventualmente ser reabsorvido, como resultado de mecanismos trombolíticos endógenos ou de uma intervenção farmacológica. Por outro lado, se o balanço entre os mecanismos trombolíticos e trombogênicos favorecem a expansão do tamanho do trombo, este pode levar a uma oclusão do vaso de forma persistente, gerando os principais desfechos clínicos do processo aterosclerótico como são o acidente vascular cerebral ou o infarto agudo de miocárdio (Kovacs, Gorog *et al.*, 2006).

Tratamento da hipercolesterolemia

Há suficiente evidencia que relaciona a hipercolesterolemia com o processo inflamatório e a instauração da placa aterosclerótica. De fato, as células endoteliais que

formam a camada íntima da parede vascular normalmente resistem à adesão dos leucócitos e, fatores desencadeadores como citocinas pro-inflamatórias e LDL oxidada, presentes na hipercolesterolemia, induzem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e aumentam o recrutamento de macrófagos e a disfunção endotelial (Libby, Okamoto *et al.*, 2010).

Pacientes que apresentam risco elevado de DAC associado a dislipidemias são sujeitos a intervenções clínicas que visem à redução do risco a través da diminuição do LDL colesterol. Esses pacientes são submetidos a intervenções não farmacológicas, relacionadas principalmente a mudanças no estilo de vida, e intervenções farmacológicas que procuram re-estabelecer valores de baixo risco do perfil lipídico pelo uso de medicamentos hipolipemiantes em pacientes que não respondem a mudanças no estilo de vida ou quando estas não são suficientes (Sposito, Caramelli *et al.*, 2007).

A associação entre o consumo de gordura e a elevação da concentração plasmática do colesterol, levando a maior incidência de aterosclerose coronária e aórtica tem sido largamente descrita. Desta forma, a intervenção nutricional tem sido adotada como uma estratégia de primeira linha na prevenção e no tratamento das dislipidemias. A orientação nutricional dependerá do caso particular de cada paciente, de acordo com sua avaliação clínica, entretanto, de modo geral a diminuição do consumo de ácidos graxos trans e do colesterol da dieta, assim como o aumento no consumo de vegetais ricos ácidos graxos monoinsaturados, fitoesteróis/estanóis e ácidos graxos ômega-3 reduzem o risco cardiovascular (Lottenberg, 2009).

Também a atividade física regular constitui uma medida auxiliar para o controle das dislipidemias e prevenção e tratamento da DAC. A prática de exercício físico

aeróbico promove a redução de triglicérides e aumento do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL), uma molécula responsável pelo transporte reverso do colesterol (TRC), processo que leva o colesterol depositado nos tecidos periféricos para sua excreção no fígado e que desta forma contribui para a diminuição do risco cardiovascular (Leaf, 2003). Atualmente, as recomendações de prática de exercício físico para mulheres e homens adultos incluem a prática de atividade aeróbica de moderada intensidade, por período mínimo de 30 minutos, 5 dias por semana, ou atividade aeróbica intensa por 20 minutos, 3 vezes por semana (Haskell, Lee *et al.*, 2007).

O tratamento medicamentoso das dislipidemias é empregado sempre que não houver efeito satisfatório das mudanças no estilo de vida ou a impossibilidade de aguardar os efeitos de tais mudanças por prioridade clínica. A escolha da classe terapêutica está condicionada ao tipo de dislipidemia presente, entretanto neste trabalho nós focaremos nas classes que modificam o LDL colesterol plasmático ou a hipercolesterolemia.

Os fármacos utilizados no tratamento da hipercolesterolemia têm como objetivo diminuir a concentração plasmática de colesterol total e LDL colesterol. Os fármacos comumente utilizados atuam através da inibição da síntese endógena do colesterol (estatinas) e da inibição da absorção intestinal do colesterol proveniente da dieta (ezetimiba).

As estatinas são inibidores competitivos da β -hidroxi- β -metil-glutaril Coenzima A redutase (HMGCR), enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA a mevalonato, um mecanismo que limita antecipadamente a síntese de colesterol (Mangravite, Thorn *et al.*, 2006) (**Figura 2**). Desde sua descoberta, estatinas naturais e quimicamente

modificadas têm sido disponibilizadas comercialmente, incluindo pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina, lovastatina, rosuvastatina e a já retirada do comércio pelos frequentes eventos de miotoxicidade, cerivastatina (Liao e Laufs, 2005).

Figura 2. Mecanismos hipolipemiantes das estatinas e ezetimiba. A redução da produção do mevalonato através da inibição competitiva da HMG-CoA redutase pelas estatinas leva à diminuição da produção do colesterol e de isoprenoides, que leva a uma redução do processo de prenilação de pequenas GTPases. A inibição de NPC1L1 leva a uma redução do colesterol pela inibição da sua absorção intestinal. Modificado de (Bays, Neff *et al.*, 2008)

A diminuição do *pool* intracelular de colesterol causado pelas estatinas leva a um aumento na atividade transcricional dos SREBFs (do inglês *Sterol responsive element binding factor*) causado pela atividade catalítica do SCAP (do inglês *SREBF cleavage activating protein*), uma proteína sensível ao conteúdo intracelular do colesterol (Sato, 2010). A atividade aumentada dos SREBFs leva ao aumento da expressão de receptores de LDL (RLDL) na superfície do hepatócito, aumentando desta forma a remoção da LDL da circulação plasmática, característica que confere a potente redução dessa molécula, nos hipercolesterolêmicos tratados com estatinas.

As estatinas são amplamente usadas na prática clínica para prevenção primária e secundária da DAC. Vários estudos clínicos demonstraram que o tratamento com estatinas diminui significativamente a colesterolemia e o risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares como, por exemplo, os estudos WOSCOPS, LIPIDS e 4S (Tousoulis, Charakida *et al.*, 2007). A terapia com estatinas tem demonstrado reduzir o risco de eventos cardiovasculares em 20% a 30%, um efeito fortemente relacionado com a magnitude da redução do colesterol (Baigent, Keech *et al.*, 2005). Por outro lado, a resposta clínica às estatinas tem-se demonstrado altamente variável e, embora as doses sejam individualmente ajustadas, grande parte dos pacientes não consegue atingir as metas de redução esperadas (Mangravite, Thorn *et al.*, 2006). Nosso grupo tem desenvolvido vários estudos farmacogenômicos que relacionam a variabilidade genética com resposta terapêutica às estatinas (Guzman, Hirata *et al.*, 2000; Salazar, Hirata, Quintao *et al.*, 2000; Sorkin, Forestiero *et al.*, 2005; Arazi, Genvigir *et al.*, 2008; Genvigir, Soares *et al.*, 2008; Willrich, Hirata *et al.*, 2008; Cerda, Genvigir *et al.*, 2010; Cerda, Genvigir, Willrich *et al.*, 2011; Rodrigues, Perin *et al.*, 2011).

A ezetimiba é um agente hipolipemiante que atua diminuindo a absorção do colesterol através de sua interação com a proteína transportadora de esteróis *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1) (Bays, Neff *et al.*, 2008). O NPC1L1 é altamente expresso no jejuno proximal e no fígado. No intestino é encontrado na superfície luminal dos enterócitos, onde participa da internalização do colesterol da dieta. No fígado está presente de forma predominante na membrana canicular, podendo estar relacionado com a recaptura de colesterol proveniente de micelas excretadas no canalículo biliar (Davis e Altmann, 2009). Desta forma, a ezetimiba contribui para a redução do colesterol plasmático através da inibição da absorção intestinal do colesterol da dieta e, possivelmente, na redução da reabsorção hepática do colesterol excretado na bile (**Figura 2**).

A terapia com ezetimiba raramente é usada na forma de monoterapia, excetuando alguns casos onde a terapia com uma estatina leva a efeitos adversos graves. Sua administração acontece geralmente de forma combinada com uma estatina, a qual pode ser utilizada em menor dose, diminuindo assim o risco de miopatia ou hepatopatia associado ao uso destes fármacos, ou permitindo também que pacientes atinjam os alvos terapêuticos de redução do LDL colesterol quando a dose máxima de uma estatina não é suficiente (Feldman, Koren *et al.*, 2004).

Apesar de que numerosos estudos clínicos têm mostrado a eficiência da ezetimiba reduzindo o colesterol plasmático (Gazi, Daskalopoulou *et al.*, 2007; Pandor, Ara *et al.*, 2009), a evidência clínica na redução do risco cardiovascular é relativamente recente. O primeiro estudo que tentou elucidar essa questão foi o ENHANCE, que analisou o efeito da ezetimiba (10 mg/dia) em comparação com o uso de placebo em indivíduos com hipercolesterolemia familiar que faziam uso de 80 mg/dia de

sinvastatina. Após 24 meses não foram observadas diferenças na progressão da lesão aterosclerótica apesar de que os indivíduos que usaram a ezetimiba reportaram maior redução do LDL colesterol (Kastelein, Akdim *et al.*, 2008). Apesar dos resultados negativos observados no estudo ENHANCE, uma nova pesquisa usando indivíduos diabéticos (estudo SANS) relatou um resultado benéfico do uso da ezetimiba quando adicionada à sinvastatina, reportando uma diminuição do tamanho da lesão aterosclerótica nos pacientes que usaram a ezetimiba após 36 meses de tratamento (Fleg, Mete *et al.*, 2008). Adicionalmente, no estudo VYCTOR, que também analisou o efeito da ezetimiba quando adicionado ao uso de uma estatina, observou-se uma redução da lesão aterosclerótica nas carótidas de pacientes com DAC (Meaney, Ceballos *et al.*, 2009).

Terapia hipolipemiante e os efeitos benéficos adicionais à redução do colesterol

A redução do colesterol plasmático está estreitamente relacionada com a diminuição do risco cardiovascular. Por outro lado, a redução do colesterol pelo uso de intervenções farmacológicas, principalmente atribuídas às estatinas que são os hipolipemiantes mais comumente utilizados, tem um efeito protetor que pode ser adicional ao da própria redução do colesterol.

As estatinas são bem conhecidas por diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol, mas também se tem proposto outras propriedades incluindo melhora da disfunção endotelial, liberação de células progenitoras do endotélio, propriedades anti-inflamatórias e atividade anti-tumoral (Von Haehling, 2009).

Como esquematizado na **Figura 2**, a redução na produção de mevalonato pelas estatinas leva a diminuição da síntese de isoprenóides, como farnesil-pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP), intermediários da síntese de colesterol. A redução na produção desses intermediários tem efeitos anti-proliferativos e antiinflamatórios, entre outros, denominados efeitos pleiotrópicos (Wang, Liu *et al.*, 2008). O FPP e o GGPP modulam a atividade pós-transcricional das GTPases pequenas das famílias Ras e Rho, mecanismo conhecido como prenilação e que pode regular inúmeras vias metabólicas (Roberts, Mitin *et al.*, 2008).

A inibição da prenilação pode causar a inibição da via de transdução de sinal, regulado pelas pequenas GTPases, que pode levar a supressão da resposta imune por limitação da maturação e ativação dos linfócitos T, inibição do recrutamento e função dos macrófagos reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios e citocinas (Cowled, Khanna *et al.*, 2007; Scheele, Marks *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, muitos dos efeitos pleiotrópicos das estatinas têm sido associados à sua capacidade de inibir a síntese dos isoprenóides. Entretanto, as estatinas também podem exercer seus efeitos pleiotrópicos através de outros mecanismos que podem ou não ser dependentes da via de prenilação de pequenas GTPases. Dois desses mecanismos que são conhecidos por ter grande impacto são: 1) melhora do processo de TRC e 2) aumento na liberação do NO nas células endoteliais.

As estatinas não só reduzem o LDL colesterol, se não também aumentam o colesterol da HDL, efeito que pode variar entre os diferentes tipos de estatinas. A HDL exerce seu efeito atero-protetor, principalmente, através da redução do colesterol depositado, nos tecidos periféricos, mediado pelo TRC. Neste processo, o excesso de colesterol nos tecidos periféricos é transportado para a apolipoproteína (apo) AI através

do transportador de membrana *ATP-binding cassette* A1 (ABCA1), gerando a pré- β -HDL que pode também receber colesterol do ABCG1 e o receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). Posteriormente, a esterificação do colesterol livre pela lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e a transferência de colesterol mediado pela proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), assim como a ação de lipases, vão gerar uma molécula de HDL menor e mais densa que pode ser interiorizada via SR-BI, no fígado, para sua excreção (Lewis e Rader, 2005).

Além do TRC, a HDL tem diversos efeitos benéficos como função anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-trombótica e também funções relacionadas ao reparo do endotélio vascular. As estatinas não só aumentam a quantidade de HDL no plasma, mas também melhoram na sua funcionalidade [revisado em (Yamashita, Tsubakio-Yamamoto *et al.*, 2010)]. Os mecanismos envolvidos no efeito das estatinas na melhora do TRC e da funcionalidade da HDL incluem a modulação de diversas vias de regulação, dentre elas as famílias das SREBFs, receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR), receptor X hepático (LXR), sinalização da família Rho e o efeito de microRNAs (miR) sensíveis a concentração de colesterol intracelular como a família do miR-33 (Cerdeira, Hirata *et al.*, 2012)

As estatinas têm sido relacionadas com um aumento na liberação de NO, sendo este mecanismo um dos principais candidatos a explicar os efeitos benéficos das estatinas na melhora da função endotelial. Os mecanismos pelos quais as estatinas podem aumentar a liberação do NO endotelial são diversos e podem incluir ativação transcricional do gene que codifica para eNOS (*NOS3*), modificações pós-traducionais da eNOS e, inclusive, mecanismo dependente da redução do *pool* intracelular do colesterol causado pelas estatinas.

Um aumento da transcrição do *NOS3* pelas estatinas tem sido descrito. Um mecanismo proposto para esse aumento é a participação da família do PPAR. Há evidências de que as estatinas podem aumentar a atividade transcricional do PPAR α e do PPAR δ (Paumelle, Blanquart *et al.*, 2006; Shen, Wu *et al.*, 2010) e de que a transcrição do *NOS3* é estimulada pela atividade dos PPAR (Yakubu, Nsaif *et al.*, 2007). Por outro lado, as modificações pós-traducionais que levam a ativação da eNOS têm sido relatadas como um alvo do efeito das estatinas. Especificamente, foi demonstrado que a inibição da via de prenilação leva a atividade aumentada da proteína quinase B (PKB/akt), responsável pela fosforilação da eNOS, resultando em atividade aumentada da enzima em células endoteliais (Ming, Viswambharan *et al.*, 2002).

Sabe-se que a eNOS forma complexos com caveolinas na membrana das células endoteliais e que esta combinação é favorecida por valores elevados de colesterol associado à expressão da caveolina-1 (Balakumar, Kathuria *et al.*, 2012). Desta forma, postula-se que uma redução da expressão de caveolina-1 associada à redução do conteúdo intracelular do colesterol causado pelas estatinas está relacionada a um aumento da liberação de eNOS na membrana do endotélio vascular (Suh, Choi *et al.*, 2010).

O efeito pleiotrópico das estatinas estava ausente em camundongos *knockout* do gene *NOS3*, sugerindo que o efeito protetor das estatinas estaria mediado pela eNOS (Stalker, Lefer *et al.*, 2001; Landmesser, Engberding *et al.*, 2004). Por outro lado, polimorfismos no *NOS3* podem modular o efeito da atorvastatina sobre a biodisponibilidade de NO e o estresse oxidativo, assim como a concentração de marcadores inflamatórios em indivíduos brasileiros (Nagasaki, Sertorio *et al.*, 2006; Souza-Costa, Sandrim *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi proposto que as estatinas

podem restituir a função endotelial pela depleção de isoprenóides, o que está relacionado com o aumento da expressão e atividade da eNOS em células endoteliais humanas (HUVEC) e, em consequência, com o aumento da produção de NO (Jantzen, Konemann *et al.*, 2007). A linhagem de células HUVEC, derivadas da veia umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), tem sido amplamente utilizada como modelo de endotélio vascular para estudos fisiológicos e patofisiológicos.

Um mecanismo regulatório menos conhecido e que também tem mostrado regular a atividade de eNOS é a regulação por miRs. Os miRs são RNAs pequenos e não codificadores que regulam negativamente a expressão protéica no nível pós-transcricional (Bartel, 2004). Por meio da ligação a uma sequência na região 3'-não traduzida (3'-UTR), eles podem diminuir a expressão gênica através da degradação de sequências alvo específicas ou prejudicando sua tradução (Kim, 2005).

Células endoteliais transfectadas com os miR-221 e miR-222 mostraram uma expressão diminuída de eNOS e liberação reduzida NO (Rippe, Blimline *et al.*, 2012). Entretanto, o mecanismo direto pela qual esses miRs podem exercer seu efeito não é conhecido, pois o a molécula de RNAm *NOS3* não é um alvo direto para miR-221 ou miR-222 de acordo com ferramentas de bioinformática que predizem a interação entre miRs e RNAm (por exemplo, TargetScan, miRanda). Desta forma, cabe destacar que o efeito modulatório sobre a eNOS exercido pelos miR-221 e miR-222, apesar de ser demonstrado de forma empírica, carece de uma explicação dos mecanismos moleculares envolvidos.

Embora pouco estudados – mas não menos importantes – alguns miRs têm sido relacionados à DAC. Por exemplo, uma análise em células endoteliais demonstrou que a expressão dos miRs 221 e 222 tem efeitos sobre as propriedades angiogênicas dessas

células (Poliseno, Tuccoli *et al.*, 2006). Da mesma forma, Zhang e colaboradores (Zhang, 2008) descreveram um papel regulatório dos miRs 21, 221 e 222 no processo proliferativo de células musculares lisas na artéria carótida, após angioplastia. Por outro lado, novas evidências indicam que miRs, como os miRs 133, 21, 320, 199a e miR-92a, estão envolvidos na doença cardíaca isquêmica (Pan, Lu *et al.*, 2010). Recentemente foi descrito que a atorvastatina – mas não a pravastatina - aumenta o número de células progenitoras do endotélio, assim como também diminui a expressão de miR-221 e miR-222 em pacientes com DAC (Minami, Satoh *et al.*, 2009).

Pesquisas clínicas que utilizaram uma estatina ou ezetimiba, como igual redução de LDL colesterol, sustentam a idéia dos efeitos pleiotrópicos das estatinas em humanos. Em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (ICC), o tratamento com sinvastatina por quatro semanas, mas não com ezetimiba, melhorou a função endotelial e reduziu o estresse oxidativo, apesar da redução da colesterolemia ter sido similar entre os dois tratamentos (Landmesser, Bahlmann *et al.*, 2005). Além disso, doses maiores de estatina durante uma terapia de associação de estatina com ezetimiba foram associadas com melhor função endotelial (Fichtlscherer, Schmidt-Lucke *et al.*, 2006) e menor ativação plaquetária (Piorkowski, Fischer *et al.*, 2007). Recentemente, Liu e colaboradores (Liu, Liu *et al.*, 2009) mostraram que a monoterapia com sinvastatina, na dose de 40 mg/dia, tem maior efeito sobre a função endotelial que o tratamento com sinvastatina (10 mg/dia) associada à ezetimiba (10 mg/dia). Esse efeito foi relacionado à redução da atividade das GTPases pequenas, embora esses indivíduos não apresentavam diferenças nos valores de PCRus.

No entanto, outros estudos que compararam a monoterapia com uma estatina com a terapia de associação estatina/ezetimiba não encontraram diferenças entre os

tratamentos. Por exemplo, o uso da sinvastatina (80 mg/dia) em indivíduos brasileiros hipercolesterolêmicos não mostrou diferenças na dilatação mediada pelo fluxo (FMD) da artéria braquial nem nos valores de PCRus quando comparados com indivíduos tratados com sinvastatina e ezetimiba (10 mg/dia + 10 mg/dia) (Araujo, Bertolami *et al.*, 2009). Da mesma forma, não houve diferenças no FMD e PCRus em pacientes com DAC submetidos ao mesmo esquema de tratamento usado no estudo anterior, sendo concluído desta forma que a redução do colesterol é mais importante que os efeitos pleiotrópicos das estatinas (Settergren, Bohm *et al.*, 2008). Por outro lado e, apesar de que os ensaios clínicos que têm avaliado o impacto em longo prazo da ezetimiba – associada ou não a uma estatina – são escassos, não há evidências que sustentem a hipótese de que os efeitos pleiotrópicos das estatinas possam contribuir com a diminuição do risco cardiovascular por uma via independente da diminuição do colesterol (Settergren, Ryden *et al.*, 2009; Tershakovec, Veltri *et al.*, 2009; Westerink e Visseren, 2009). Em uma meta-análise de regressão realizada por Robinson e colaboradores (Robinson, Smith *et al.*, 2005) foi concluído que as estatinas não contribuem com uma redução adicional do risco cardiovascular, além dos benefícios esperados relacionados à magnitude da redução do LDL colesterol. Somado isso, é relevante considerar o trabalho descrito por Taylor e colaboradores (Taylor, Villines *et al.*, 2009), os quais propõem que, associado à estatina, é mais importante o uso de um fármaco que aumente os valores de HDL colesterol – como a niacina – do que a redução adicional das concentrações plasmáticas de LDL colesterol alcançadas pelo uso concomitante da ezetimiba.

Diversos estudos têm avaliado a influência das estatinas sobre os marcadores de adesão celular e marcadores inflamatórios, embora na maior parte desses estudos não se

tenha considerado se os efeitos pleiotrópicos das estatinas são ou não independentes da redução do colesterol. Foi observado que as estatinas podem reduzir as concentrações de PCRus circulante em pacientes hipercolesterolêmicos (Ridker, Rifai *et al.*, 2001). Da mesma forma foi descrito que a sinvastatina diminui a expressão de IL-6, IL-8 e NFκB em células epiteliais (Sakoda, Yamamoto *et al.*, 2006). Adicionalmente, Kagami e colaboradores demonstraram que a sinvastatina diminui a expressão de RNAm de TNFα e IL-6 em mastócitos de murino (Kagami, Kanari *et al.*, 2008).

Também foi demonstrado que a sinvastatina atenua o processo inflamatório mediante a redução da IL-1β em células da microglia de ratos Wistar após injúria do cérebro (Li, Mahmood *et al.*, 2009), assim como a fluvastatina – em monoterapia ou associada com ezetimiba – pode diminuir a IL-1β plasmática em pacientes com hipercolesterolemia primária (Alvarez-Sala, Cachofeiro *et al.*, 2008). Entretanto, a inibição da prenilação da GTPase pequena Rac-1 por meio do uso da sinvastatina aumentou a liberação de IL-1β em células THP-1 (Kuijk, Beekman *et al.*, 2008), num processo que segundo os autores envolve a ativação da via da caspase-1.

Foi descrito que a atorvastatina impede o incremento da secreção da IL-6 e MCP-1 através da inibição da ativação do NFκB em células endoteliais humanas (Li, Li *et al.*, 2010), e que a sinvastatina pode diminuir a secreção de MCP-1 e MMPs em camundongos deficientes do gene da Apolipoproteína E (*APOE*) (Zhang, Naggar *et al.*, 2009). Por outro lado, num modelo de camundongos similar ao anterior – *APOE knockout* - foi observado que a fluvastatina pode prevenir o rompimento da placa aterosclerótica, principalmente através da redução de MMP-9, já que as MMPs -2, -3 e -14 não foram modificadas pelo tratamento (Nakamura, Sasaki *et al.*, 2008).

De acordo com Kim e colaboradores, as propriedades anti-inflamatórias das estatinas estão relacionadas à sua capacidade de reduzir o recrutamento de células inflamatórias em resposta a fatores pro-inflamatórios (Kim, Ryu *et al.*, 2007), num processo que poderia estar vinculado à diminuição de moléculas de adesão no endotélio e nos monócitos. O tratamento com sinvastatina (20 mg/dia) por 12 semanas demonstrou diminuir a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 em pacientes com esclerose múltipla (Del Papa, Cortiana *et al.*, 2008). Da mesma forma, o tratamento com sinvastatina reduziu a expressão de P-Selectina e E-Selectina em células endoteliais em cultura (Eccles, Sowden *et al.*, 2008).

Serrano e colaboradores (Serrano, Pesaro *et al.*, 2009) mostraram que a sinvastatina pode bloquear a super-expressão das moléculas de adesão monocitárias Mac-1 e CD14, em resposta a LDL natural, em monócitos provenientes de indivíduos hipercolesterolêmicos.

Interessantemente, foi demonstrado que a atorvastatina e a pravastatina podem aumentar a expressão de VLA-4 (Fildes, Shaw *et al.*, 2008), porém os autores propuseram que esse efeito poderia ser um mecanismo compensatório no monócito em resposta à diminuição da expressão de VCAM-1, o receptor para VLA-4, nas células endoteliais. Por outro lado, o tratamento com estatinas também diminuiu a expressão do mediador da adesão LFA-1, por um mecanismo dependente da prenilação de GTPases pequenas (Raemer, Kohl *et al.*, 2009).

Neste projeto, busca-se esclarecer o impacto do efeito de inibidores da síntese e de absorção do colesterol nos mecanismos moleculares que regulam o processo inflamatório e na adesão celular usando modelos de estudo *in vitro*, estudando células HUVEC como modelo biomimético de endotélio vascular e células THP-1 como

modelo de monócitos; e *in vivo*, estudando células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina e ezetimiba.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos induzidos pelo tratamento com inibidores da síntese (estatinas) e da absorção (ezetimiba) do colesterol na modulação da expressão de biomarcadores de inflamação e de adesão celular em células HUVEC, células THP-1 e em indivíduos hipercolesterolêmicos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba sobre a expressão protéica e de RNAm de eNOS, moléculas de adesão endoteliais (E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1) emarcadores inflamatórios (TNF α , IL-6, NFkB, IL-1B, IL-8, MMP-9, MCP-1), em células HUVEC.
- Estudar a papel do NO na modulação da resposta às estatinas, usando modelos de células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm e pelo uso de inibidor da síntese do NO.
- Estudar o efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba no perfil de expressão dos miR-221, miR-222 e miR-1303, em células HUVEC.
- Avaliar os efeitos da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão protéica e de RNAm das moléculas de adesão monocitárias (PSGL1, L-selectina, VLA-4, LFA-1, Mac-1), em células THP-1.
- Analisar a influencia da sinvastatina e daezetimiba no perfil de expressão gênica de moléculas de adesão endoteliais e monocitária, eNOS e mediadores de inflamação

em células mononucleares de sangue periférico obtidas de indivíduos hipercolesterolêmicos.

- Avaliar a concentração de PCRus, NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, MMP-9, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1, sE-selectina e o perfil lipídico no soro de pacientes hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina e ezetimiba.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos participantes de estudo

Inicialmente foram selecionados 64 indivíduos hipercolesterolêmicos (HC) para este estudo, de ambos os gêneros, com idades entre 42 e 72 anos. Os indivíduos foram selecionados na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP).

A seleção dos pacientes HC (LDL colesterol $> 160\text{mg/dL}$) para serem incluídos no protocolo terapêutico foi feita de acordo com normas brasileiras para dislipidemias (Sposito, Caramelli *et al.*, 2007), segundo os seguintes critérios:

Critérios de inclusão: LDL colesterol $> 160\text{ mg/dL}$ e TG $< 350\text{ mg/dL}$. Foram incluídos indivíduos fumantes e não fumantes, com e sem hipertensão, obesos e não obesos, mulheres em pré e pós-menopausa, todos eles sem eventos de DAC. Foram considerados fumantes indivíduos que fumam qualquer quantidade de tabaco ou que pararam de fumar há menos de 1 ano. Foram considerados hipertensos indivíduos com diagnóstico clínico de acordo com informação no prontuário do paciente ou aqueles que usavam anti-hipertensivos. História de DAC foi considerada eventos prévios de infarto agudo de miocárdio ou angina. Também foi obtida informação sobre a prática de exercício físico dos pacientes, sendo considerado como critério a prática de exercício físico aeróbico moderado por pelo menos 30 minutos três vezes por semana.

Critérios de exclusão: Não foram incluídos no estudo indivíduos com doenças da tireóide, diabetes melito, doença hepática e renal grave, mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos, e pacientes em uso de anti-inflamatórios.

Critérios de interrupção: Foi considerado como critério de interrupção do tratamento a apresentação de reação adversa aos medicamentos, após avaliação médica, de acordo com o monitoramento de função hepática (ALT) e muscular (CK).

3.2. Protocolo terapêutico

Os indivíduos HC foram orientados a fazer uso de dieta com baixo conteúdo de colesterol e gorduras saturadas por 4 semanas. Após esse período os indivíduos com concentração sérica de LDL colesterol superior a 160 mg/dL foram tratados com 10mg/dia de ezetimiba por um período de 4 semanas. Após esse período os pacientes foram tratados com 10mg/dia de sinvastatina por 8 semanas e, finalmente, os pacientes foram tratados com associação desinvastatina (10mg/dia) e ezetimiba (10 mg/dia) por mais quatro semanas. Após cada etapa do tratamento, os indivíduos foram avaliados pela equipe médica que decidiu sobre a permanência ou não do indivíduo no estudo.

Dos 64 pacientes selecionados inicialmente, 1 foi excluído por suspeita de DAC, 4 apresentaram doença de tiróide, 6 indivíduos não tinham indicação de tratamento hipolipemiante após período de dieta, 3 foram diagnosticados com DM e 1 apresentou hipertrigliceridemia. Além disso, outros 6 pacientes desistiram de continuar no protocolo terapêutico acusando motivos pessoais, 3 pacientes foram excluídos por não aderir ao esquema terapêutico e, finalmente, 2 pacientes relataram intolerância aos medicamentos referindo dor estomacal. Desta forma, um grupo de 38 pacientes HC completou o protocolo terapêutico e foi utilizado para as análises posteriores no presente estudo.

3.3. Amostras biológicas

Antes e após o tratamento com sinvastatina e ezetimiba, foram coletadas amostras do sangue, após jejum de 12-14 horas, mediante punção venosa em tubos com anticoagulante EDTA, para extração de RNA (10 mL) e obtenção de plasma, e em tubos sem anti-coagulante, para as determinações bioquímicas (5 mL). No soro foram avaliados: perfil lipídico, apoAI, apoB, NO, PCRus e as enzimas CK e ALT. Também foram determinados TNF- α , IL-6, IL-1B, IL-8, MMP-9, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina no plasma. O hormônio estimulante da tireóide (TSH) e tiroxina (T4) livre foram avaliados somente na primeira coleta dos indivíduos, com a finalidade de excluir os portadores de hipo ou hipertireoidismo.

3.4. Determinações laboratoriais

3.4.1. Determinações bioquímicas

As concentrações de colesterol total, HDL colesterol e triglicérides foram determinadas utilizando-se métodos enzimático-colorimétricos (Fossati e Prencipe, 1982; Siedel, Hagele *et al.*, 1983; Nauck, Marz *et al.*, 1998). As concentrações de LDL colesterol e VLDL colesterol foram calculadas pela fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewald, Levy *et al.*, 1972). A apoAI e apoB foram determinadas por métodos imunoturbidimétricos (Mount, Kearney *et al.*, 1988). As atividades de ALT e CK foram determinadas por métodos cinéticos no UV (Bergmeyer, Scheibe *et al.*, 1978; Horder, Elser *et al.*, 1991). As determinações de T4 livre e TSH foram realizadas por imunoensaio competitivo e método imunométrico, respectivamente (Witherspoon, El Shami *et al.*, 1988; Hay, Bayer *et al.*, 1991).

O NO foi determinado por ozono-quimioluminiscência usando o analisador de NO Siemers 280 (GE *Analytical Instruments*, PE, EUA). A concentração de PCRus foi determinada por imunoturbidimetria usando o kit comercial PC-R Testing BNII (Siemens Medical/BayerDiagnostics, Tarrytown, NY, EUA).

3.4.2. Determinação de citocinas e formas solúveis de moléculas de adesão

Para a determinação das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1B, IL-8 e MCP-1, a metaloproteinase MMP-9 e as formas solúveis das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina foi utilizada a metodologia milliplex. Nessa metodologia são utilizadas esferas marcadas com fluorescência vermelha e violeta, onde a composição de cada um desses fluorocromos determina a denominada “região” de cada esfera. Anticorpos para cada analito são fixados na superfície das esferas com uma “região” específica, o que permite determinar vários analitos num único ensaio, sendo que cada esfera é diferenciada por sua composição de fluorocromos específica para cada analito. Posteriormente, as esferas capturam o analito específico de acordo com o anticorpo na sua superfície e logo são incubadas com um segundo anticorpo biotinilado. Finalmente, as esferas são incubadas com estreptavidina conjugada com PE e analisadas em analisador de fluxo que mede a fluorescência quando as esferas são excitadas com laser a 635nm para determinar a região da esfera e a 532nm para determinar de forma quantitativa a fluorescência emitida pelo PE que é proporcional à quantidade de proteína capturada na superfície de cada esfera.

As concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, IL-1B, IL-8 e MCP-1 foram determinadas por meio da tecnologia *Milliplex* usando o kit comercial *multiplex*

adipokin panel B -HADK2-61K-B06 (Merck Millipore, BA, EUA). Para as determinações de MMP-9, sVCAM-1, sICAM-1 e sE-selectina no plasma dos pacientes foi usado o kit comercial *multiplex cardiovascular panel 4* -HCVD1-67AK-04 (Merck Millipore, BA, EUA). A determinação de IL-6, IL-1B, IL-8 e MCP-1 foi também realizada em sobrenadante de cultura de células HUVEC usando o kit *Fluorokine Map human panel A* -LUH000- (R&D Systems, Inc., MN, EUA). O processamento dos padrões, controles e amostras foi realizado de acordo com as recomendações dos fornecedores e a leitura das esferas fluorescentes foi realizada no equipamento Luminex 200 (Gen-Probe, CA, EUA) onde, no mínimo 50 eventos foram computados para cada analito. Finalmente, a análise dos dados obtidos foi realizada usando o programa *Milliplex Analyst* (Merck Millipore, BA, EUA).

3.5. Linhagens Celulares, Condições de Cultivo e tratamentos.

Como modelo de células endoteliais foi utilizada a linhagem de células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endotelial Cells*) e como modelos de monócitos foram utilizadas as células THP-1 (*Human acute monocytic leukemia cell line*). Para garantir a homogeneidade das características morfofisiológicas, as células HUVEC e as células THP-1 foram mantidas em cultura por períodos nunca superiores a 8 e 4 semanas, respectivamente, conforme metodologia padrão para cultivo celular.

As células THP-1 e HUVEC foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, bicarbonato de sódio 44 mmol/L, estreptomicina 5.000 µg/mL e penicilina 5.000 U/mL. As condições de cultivo foram a 37° C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Foram feitos repiques a fim

de manter as células em fase log de crescimento, entre as concentrações de $2 \text{ a } 8 \times 10^5$ células por mL para as THP-1 e de $1 \text{ a } 10 \times 10^5$ células por mL para as células HUVEC.

A sinvastatina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e ezetimiba –gentilmente doada pela Merck/Shering-Plough (Nova Iorque, NJ, EUA)- foram dissolvidas em etanol PA (Merck, São Paulo, SP, Brasil), entretanto a atorvastatina - gentilmente doada pela Pfizer Farmacêutica Ltda. (Guarulhos, SP, Brasil) - foi dissolvida em metanol PA (Merck, São Paulo, SP, Brasil). A concentração final de etanol e metanol no meio de cultura não excedeu o 0,5% e 0,1%, respectivamente, conforme estudos prévios que mostraram que esses veículos não são tóxicos nessas concentrações. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 na ausência (controle de veículo) e na presença de concentrações variáveis sinvastatina, atorvastatina ou ezetimiba.

3.6. Curva de Crescimento e Tempo de Dobramento das Populações Celulares

Ensaio de curvas de crescimento foram realizados a partir de suspensões de 4×10^4 células/mL de células THP-1 semeadas em garrafas de 25 cm^2 com volume final de 5 mL de meio de cultura ou a partir de células HUVEC em placas de 6 poços com volume final de 2 mL de meio de cultura. O número de células foi determinado a cada 24 horas por microscopia óptica utilizando a câmara de Neubauer durante oito (THP-1) ou seis (HUVEC) dias. A viabilidade celular foi verificada por exclusão do azul de Tripán 1% em tampão salina fosfato pH 7,4 (PBS –NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 8,0 mM; KH_2PO_4 1,4 mM) (Fernandes, Marques-Da-Costa *et al.*, 1994). A porcentagem de células viáveis foi calculada pela relação do número de células viáveis (não coradas) pelo número de células totais.

O tempo de dobramento das populações celulares (PDT) foi calculado de acordo com as fórmulas:

$$PDT = 1/r \quad \text{e} \quad r = 3,32 (\log N_h - \log N_i) / (t_2 - t_1), \text{ onde:}$$

r = taxa de multiplicação celular

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

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

3.7. Efeito dos fármacos na viabilidade celular e fragmentação do DNA

A porcentagem de células viáveis foi avaliada a partir de uma suspensão de 1×10^6 células/mL por citometria de fluxo, utilizando uma solução de iodeto de propídeo (PI) 50 mg/mL em PBS. O PI é um composto fluorescente hidrossolúvel que se liga diretamente ao DNA intercalando-se entre as bases nitrogenadas, com pouca ou nenhuma preferência por alguma sequência específica, no entanto, não consegue ultrapassar membranas intactas, sendo, portanto excluído de células viáveis (Lima, Kanunfre *et al.*, 2002).

As células foram incubadas com PI (50 μ g/mL) a temperatura ambiente por 5 minutos e avaliadas em um citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando o programa FACSDiva (Becton Dickinson). Para cada teste, foram avaliados dez mil eventos. A perda da integridade de membrana é determinada quando a fluorescência emitida pelo PI aumenta.

A fragmentação de DNA foi determinada por citometria de fluxo após coloração com PI, de acordo com o método descrito por Nicoletti e colaboradores (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991). Resumidamente, 5×10^5 células foram ressuspensas em 0,2

mL de tampão de lise (citrato de sódio 0,1%; Triton X-100 0,1%) contendo PI 50 µg/mL. As células lisadas foram incubadas no escuro a 4°C por 2 horas e utilizadas para a análise de fragmentação do DNA por citometria de fluxo. O PI liga-se às bases nitrogenadas e a fragmentação é observada pelo aparecimento de partículas pouco fluorescentes, evidenciando que o DNA foi clivado. Devido à alta condensação e pequeno tamanho de fragmentos deste o PI não consegue ligar-se eficientemente às bases.

3.8. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico para extração de RNA total

As CMSP dos pacientes HC foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (Salazar, Hirata e Hirata, 2000). Em resumo, em tubos cônicos de 15 mL de capacidade, foram pipetados 10 mL de sangue com EDTA (1 mg/mL), separado o plasma por centrifugação (10 min x 3000 rpm) e o volume restante contendo os elementos celulares foi diluído com igual volume de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4 e EDTA a 10 mM, pH 8,0). Logo, 10 mL do sangue diluído foram pipetados sobre 3,5 mL de Ficoll-Hypaque. O tubo foi centrifugado a 800 g por 30 min., em temperatura ambiente e as células mononucleares foram recolhidas, lavadas três vezes com o dobro do seu volume em tampão Tris-EDTA, contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

3.9. Isolamento e avaliação do RNA total de CMSP, células HUVEC e THP-1

O RNA total de CMSP, células HUVEC e THP-1 foi extraído a partir de uma suspensão de células contendo entre 5 a 10×10^6 células/mL, lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA). Brevemente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 g por 15 min. a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa, foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 g por 10 min., a 4°C, e lavado com etanol a 75% (v/v). Posteriormente, o RNA foi seco à temperatura ambiente e diluído em 50µL de água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), e armazenado a -70°C para posterior análise.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (Sambrook e Russel, 2001) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A260nm/A280nm (Sambrook e Russel, 2001). A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento bioanalyzer[®] 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e utilizadas na quantificação de RNAm apenas as amostras que apresentaram um RIN (*RNA integrity number*) superior a 5 (**Figura 3**).

Figura 3. Gel e electroforograma de amostra de RNA total extraída de células THP-1 analisada no Bioanalyzer. Pode-se observar uma boa integridade da amostra baseado no valor do RIN (9,6).

3.10. Análise da expressão gênica por qRT-PCR em tempo real

A expressão do RNAm dos genes estudados nas células HUVEC, THP-1 e CMSP humanas foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real.

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de transcrição reversa foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Resarch Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25°C por 10min, 42°C por 50min e 70°C por 15min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada por qRT-PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan® FAST RTPCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda TaqMan® foi detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada

pelo serviço “*Assay by design*” e/ou “*Assay on demand*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para os genes *SELP*, *SELE* e *NOS3* foi utilizado o sistema de amplificação *FASTSybr Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando os iniciadores descritos na **Tabela 1** (Integrated DNA Technologies, Inc., San Diego, CA, EUA). Os iniciadores dos genes *SELP* e *SELE* foram utilizados na concentração de 100nM na reação e os iniciadores do *NOS3* a 200nM na reação. O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo *Sybr Green* foi detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Curvas de dissociação foram realizadas para avaliar a especificidade dos iniciadores.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *SELP*, *SELE* e *NOS3*.

Gene	Iniciadores 5' → 3'	Tamanho do produto
<i>SELP</i>	Senso: AAT GTA CTC GAT CGG GAC GC Antisenso: GCT ATG CCT TTG CAG GTT GG	241pb
<i>SELE</i>	Senso: CCC TAT GCT ACA CAG CTG CC Antisenso: GCT TCC ATG CTC AGG GGA TT	164pb
<i>NOS3</i>	Senso: TCC CCG GGT CCT GTG TAT G Antisenso: TCC ATC AGG GCA GCT GCA AA	153 pb

A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa. Com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para nosso modelo, seis genes [ubiquitina C (*UBC*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), beta-2-microglobulina (*B2M*), hipoxantinafosforibosil-transferase I (*HPRT1*), complexo da succinatodesidrogenase, subunidade A (*SDHA*) e hidroximetil-bilano sintase (*HMBS*)] foram testados e analisados no programa *Genorm* (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002). As sequências de iniciadores e sondas para esses genes são descritas na **Tabela 2**.

As análises de quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes estudados foram realizadas utilizando-se o método do Ct comparativo. Para os experimentos *in vitro* os valores de expressão foram apresentados como valores relativos a um calibrador, com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Para os experimentos em CMSP dos pacientes HC não foi utilizado calibrador, então os valores de expressão gênica foram apresentados como $2^{-\Delta C_t}$. Previamente, foram calculadas as eficiências dos ensaios, sendo considerados adequados valores entre 90% e 110% (Livak e Schmittgen, 2001).

Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras foram analisadas em duplicata. Controles dos reagentes foram feitos em cada conjunto de reações para avaliar possíveis contaminações.

Tabela 2. Sequência de iniciadores e sonda dos genes endógenos utilizados para qPCR.

Gene	Sequência iniciadores/sondas 5' → 3'	Tamanho do produto
<i>UBC</i>	Senso: ATT TGG GTC GCG GTT CTT G Antisenso: TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT Sonda: TCG TCA CTT GAC AAT GC	133 pb
<i>GAPDH</i>	Senso: GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA Antisenso: CTG GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC Sonda: TCA GCC TTG ACG GTG C	230 pb
<i>B2M</i>	Senso: TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T Antisenso: TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T Sonda: CTC CAC AGG TAG CTC T	86 pb
<i>HPRT1</i>	Senso: TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA Antisenso: GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT Sonda: CCT TGG TCA GGC AGT AT	94 pb
<i>SDHA</i>	Senso: TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG Antisenso: CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G Sonda: TCC ATT TCT GCT CAG TAT C	86 pb
<i>HMBS</i>	Senso: GGC AAT GCG GCT GCA A Antisenso: GGG TAC CCA CGC GAA TCA C Sonda: CGG AAG AAA ACA GCC	64 pb

NOTA: Todas as sondas para os genes endógenos foram marcadas com o fluoróforo VIC na extremidade 5' (fluoróforo *reporter*) e ligadas com uma *minor groove binding* (*quencher* não fluorescente) na extremidade 3'. *UBC*, ubiquitina C; *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *B2M*, beta-2-microglobulina; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosil-transferase I; *SDHA*, complexo da succinato desidrogenase, subunidade A; *HMBS*, hidroximetil-bilano sintase.

3.11. Análise da expressão protéica por citometria de fluxo

A expressão protéica das moléculas de adesão, nas linhagens HUVEC (P-Selectina e ICAM-1) e THP-1 (PSGL1, L-selectina, VLA-4, LFA-1 e Mac-1), tratadas e não tratadas com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba foi avaliada por ensaio de imunofluorescência indireta, devido a que essas proteínas encontram-se na superfície celular.

Resumidamente, células (5×10^6 células) foram incubadas com anticorpo primário por 45 min a 4°C. Após duas lavagens, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (sc-2010, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) por 45 min a 4°C. A fluorescência das células (20.000 eventos) foi medida por citometria de fluxo, em comprimento de onda de 530 nm, o qual detecta a fluorescência do FITC. Como controle negativo foi utilizado PBS ao invés do anticorpo primário. Todos os anticorpos foram obtidos da Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e são descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Proteína	Identificação*	Clone	Diluição Anticorpo	
			Primário	Secundário
P-Selectina	sc-19996	AK4	1:50	1:50
ICAM-1	sc-107	15.2	1:100	1:100
PSGL1	sc-32302	215	1:50	1:50
L-selectina	sc-13505	lam1-116	1:50	1:50
VLA-4	sc-81625	7.2	1:100	1:100
LFA-1	sc-7306	38	1:100	1:100
Mac-1	sc-20050	2LPM19c	1:50	1:50

* Identificação fornecida pela *Santa Cruz Biotechnologies*.

3.12. Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito de hipolipemiantes em células HUVEC

Para avaliar se os efeitos dos fármacos sobre a expressão dos marcadores inflamatórios e de adesão celular são independentes da regulação da eNOS, foi realizado o silenciamento do *NOS3* para estudar se, quando há modulação pelas estatinas, esse efeito é mantido em células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm.

Alternativamente as células HUVEC foram incubadas com L-NG-Nitroarginina Metil Ester (L-NAME). O L-NAME é um derivado da L-arginina que inibe a síntese de NO mediada pelas enzimas óxido nítrico sintase (Pfeiffer, Leopold *et al.*, 1996). O L-NAME (100 μ M) foi adicionado junto ou sem o fármaco estudado durante 24 h antes da quantificação de proteínas.

3.12.1. Desenvolvimento de modelo celular com *NOS3* silenciado por RNA de interferência

O silenciamento do *NOS3* foi realizado utilizando o conjunto de RNAs pequenos de interferência (siRNA) contidos no kit *NOS3 Stealth RNAi siRNA* (cat n° HSS107236) (Life Technologies, CA, EUA). Esse kit é composto por três siRNAs dupla fita (identificados como NOSHSS 107236, 107237 e 107238, **Tabela 4**) desenhados em diferentes regiões do transcrito. De acordo com a recomendação do fornecedor, foram testados os três siRNAs isoladamente e uma mistura deles para escolher aquele com maior eficiência na redução de expressão de *NOS3*. O melhor resultado foi observado com o siRNA NOSHSS-107238 como mostrado na seção de resultados e, portanto, este siRNA foi utilizado nos ensaios posteriores.

Tabela 4. Sequência dos siRNA utilizados nos ensaios de silenciamento gênico do *NOS3*

siRNA	Sequência5' → 3'
NOSHSS-107236	<p>Senso: UGA GUA UGA GCU GGU GUC CCU CGA A</p> <p>Antisenso: UUC GAG GGA CAC CAC GUC AUA CUC A</p>
NOSHSS 107237	<p>Senso: GAA GAG GAA GGA GUC CAG UAA CAC A</p> <p>Antisenso: UGU GUU ACU GGA CUC CUU CCU CUU C</p>
NOSHSS 107238	<p>Senso: CAG GCU ACA AUC CGC UCA GUG GAA A</p> <p>Antisenso: UUU CCA CUG AGC GGA UUG UAG CCU G</p>

NOTA: As seqüências senso e antisenso de cada conjunto de oligonucleotídeos são complementares para gerar o siRNA. Eles são fornecidos na forma de dupla fita.

Para avaliar a qualidade dos resultados dos ensaios de RNAi foram incluídos controles positivo, negativo e controle de células não transfectadas. Como controle positivo foi utilizado o kit comercial *StealthRNAi GAPDH Positive Control* (Life Technologies, CA, EUA) que inclui um conjunto de siRNAs para o *GAPDH*, sendo considerada uma reação de silenciamento efetiva uma diminuição superior a 70% na expressão gênica. Como controle negativo foram utilizados siRNAs com baixa similaridade com o genoma de mamíferos, usado para indicar eventuais alterações causadas pela liberação dos siRNA nas células. Com essa finalidade foi usado o kit *Stealth RNAi Negative Control* que é composto por três RNAs pequenos dupla fita com conteúdo alto, medio e baixo de citocinas e guaninas (CGs), respectivamente. Foi

escolhido o siRNA com conteúdo médio que é usado como controle para siRNAs com conteúdo de CG entre 45 e 55% devido a que o siRNA para *NOS3* escolhido para os ensaios tinha 52% de GC.

A transfecção dos siRNAs em células HUVEC foi realizada utilizando o kit de transfecção *Lipofectamine™ RNAiMAX* (Life Technologies, CA, EUA). Resumidamente, 30.000 células foram distribuídas em placas de 12 poços e após 16 h foram transfectadas com o siRNA correspondente (30 pmol) usando 2 µl de *Lipofectamine™ RNAiMAX* em 1,2 mL de meio RPMI 1640 livre de soro e antibióticos. Após 14 h de incubação, o meio foi substituído por meio RPMI completo e incubado durante outras 24h para análise. Esse período de 24h foi posteriormente utilizado para realizar o tratamento com os fármacos. Para avaliar o sucesso do ensaio de silenciamento gênico foi avaliada a expressão do *NOS3* nas células alvo e as controles mediante quantificação relativa por RT-PCR em tempo real.

3.13. Análise dos micro-RNAs

Foi realizada a quantificação dos micro-RNAs (miRs) miR-221, miR-222 e miR-1303 (miRBase n° MI00000298, MI0000299 e MI0006370, respectivamente) nas células HUVEC tratadas com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba. O RNA total contendo a fração de RNAs pequenos foi extraída das células HUVEC utilizando o kit *mirVana™* *Paris* miRNA isolation (Ambion Inc., TX, EUA) de acordo com as indicações do fornecedor.

A quantificação dos miRs foi realizada usando o sistema *Taqman stem-loop* PCR em tempo real (Life Technologies, CA, EUA). Iniciadores *stem-loop* específicos

para cada miR foram usados para sintetizar o cDNA a partir de 10 ng de RNA total, utilizando o conjunto de reagentes *Taqman micro RNA transcription kit* (Life Technologies, CA, EUA). Ensaios pré-desenhados foram usados para realizar a quantificação dos miRs. Para o cálculo da expressão relativa foi inicialmente realizada a escolha do miR de referência endógena mais estável usando o programa geNorm. Com essa finalidade foram avaliados 4 miRs nucleolares (RNU44, RNU6B, RNU58 e RNU24).

3.14. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa *Minitab* versão 15.0 (Minitab Inc., State College, PA, EUA) e o programa *Prisma* versão 5.0 (Graph Pad Software Inc., CA, EUA). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

Para a análise *in vivo*, inicialmente as variáveis foram analisadas descritivamente antes e após os tratamentos com sinvastatina e ezetimiba. As comparações entre os diferentes tratamentos nos indivíduos HC foram realizadas pelo teste de *one-way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey.

Nas culturas celulares, o teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni foi utilizado para comparar o efeito dos diferentes tratamentos e tempos de incubação com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba usando sempre como referência o controle de veículo estimulado com TNF α . Quando apenas um tempo de tratamento (24 h) foi testado, o teste *one-way* ANOVA seguido de Bonferroni foi usado.

4. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado nos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP) e pela Comissão Nacional de ética em Pesquisa (CONEP), tendo sido aprovado em todas as instancias (**Anexos 1, 2 e 3**).O trabalho também contou com a aprovação da Comissão Interna de Biossegurança da FCF/USP (**Anexo 4**) que tem Certificado de Qualidade de Biossegurança (CQB nº 0090/98) (**Anexo 5**). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciar o protocolo terapêutico (**Anexo 6**).

5. RESULTADOS

5.1. Análise de citotoxicidade dos fármacos nas populações celulares

5.1.1. Curva de crescimento de células THP-1 e HUVEC

As células THP-1 foram mantidas em cultura durante oito dias a partir de uma concentração inicial de 4×10^4 células/mL. As contagens foram realizadas a cada 24 h a partir de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Os resultados podem ser visualizados na **Figura 4**, na qual se pode observar que o perfil de crescimento destas células se mostrou normal em relação às diferentes fases do crescimento de cultura celular (lag, logarítmica, estacionária e declínio). O tempo de dobramento celular da linhagem THP-1 foi de 24,42 horas.

Figura 4. Curva de crescimento das células THP-1. As células THP-1 foram mantidas durante oito dias em meio RPMI 1640. Dados são apresentados como média $\pm$ SEM obtidos de dois experimentos independentes realizados em duplicata. PDT, tempo de dobramento da população celular (horas).

Entretanto, as células HUVEC foram mantidas durante seis dias em meio RPMI 1640 e as contagens realizadas a cada 24 h. Na **Figura 5** é apresentada a curva de crescimento dessas células, obtida de dois experimentos independentes a partir de suspensões celulares de 4×10^4 células/mL. Podem-se observar apenas as fases de crescimento lag, exponencial e estacionária, já que as células semeadas na concentração de 4×10^4 células/mL não apresentaram a fase de declínio após seis dias de cultura.

Figura 5. Curva de crescimento das células HUVEC. As células foram mantidas durante seis dias em meio RPMI 1640. Dados são apresentados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ obtidos de dois experimentos independentes realizados em duplicata. PDT, tempo de dobramento da população celular (horas).

5.1.2. Efeito dos fármacos na proliferação celular de células THP-1

Para avaliarmos o efeito dos fármacos na proliferação celular da THP-1, foram realizadas curvas de crescimento para cada tratamento com concentrações variáveis de

atorvastatina (0 a 20 μM), sinvastatina (0 a 10 μM) e ezetimiba (0 a 5 μM) por um período de 96hs. As células foram colocadas em garrafas de 25 cm^2 em uma concentração inicial de 1×10^5 células/mL em um volume total de 5 mL por garrafa. As contagens celulares foram realizadas a cada 24h e os resultados são apresentados na **Figura 6**. Pode se observar que as concentrações maiores de atorvastatina (1, 10 e 20 μM) e de sinvastatina (10 μM) exercem um efeito anti-proliferativo no crescimento celular dos monócitos a partir de 48 h de tratamento. Quando comparado com o controle do veículo, nota-se também um menor crescimento celular na concentração de 0,1 μM de atorvastatina e de 1 μM de sinvastatina a partir de 96 h (**Figura 6 A e B**). Por outro lado, o tratamento com ezetimiba (**Figura 6C**) até 5 μM não modificou a curva de crescimento quando comparado com o controle de veículo em até 96 horas de tratamento.

5.1.3. Efeito dos fármacos na proliferação celular de células HUVEC

Foram realizadas curvas de crescimento para cada tratamento com concentrações variáveis de atorvastatina (0 a 10 μM), sinvastatina (0 a 10 μM) e ezetimiba (0 a 5 μM) por um período de 96h. As células foram colocadas em placas de seis poços em uma concentração inicial de 1×10^5 células/mL em um volume total de 2 mL por poço. As contagens celulares foram realizadas no período de 12h de incubação e posteriormente a cada 24h de tratamento e os resultados são apresentados na **Figura 7**.

Pode-se observar que já no período de 24h, a maior concentração testada das estatinas (10 μM) afeta a proliferação celular (**Figura 7A e B**). Desde as 48h de tratamento, a atorvastatina a partir da concentração de 1 μM (**Figura 7A**) e a

sinvastatina a partir de 5 μ M (**Figura 7B**) exercem um efeito anti-proliferativo no crescimento celular das células HUVEC. A ezetimiba (até 5 μ M) não afetou o crescimento celular em células tratadas durante até 96h (**Figura 7C**).

Figura 6. Curva de crescimento de células THP-1 tratadas com (A) atorvastatina, (B) sinvastatina e (C) ezetimiba. As células THP-1 foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 durante 96h na ausência (0 μ M) e presença dos diferentes fármacos. Dados representam média $\pm$ SEM (n=2).

Figura 7. Curva de crescimento de células HUVEC tratadas com (A) atorvastatina, (B) sinvastatina e (C) ezetimibe. As células HUVEC foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 durante 96h na ausência (0 uM) e presença dos diferentes fármacos. Dados representam média $\pm$ SEM (n=2).

5.1.4. Efeito dos fármacos na integridade de membrana e fragmentação de DNA das células THP-1

O tratamento com atorvastatina nas variáveis concentrações (0,1 a 20 μ M) não afetou a viabilidade celular ou levou à fragmentação de DNA nas células THP-1 após 24 h de tratamento. Nas **Figuras 8 e 9** são representados os histogramas obtidos pela análise por citometria de fluxo para o controle (0 μ M) e tratado com 20 μ M, pelos quais

pode-se observar que não houve aumento de células com membranas não viáveis e o DNA está íntegro. A análise a partir da comparação com o controle mostra uma viabilidade de 95% e uma fragmentação de apenas 11,1%. Uma síntese dos resultados do estudo de integridade de membrana e fragmentação é apresentada na **Figura 10**. Pode-se observar que, da mesma forma que com a atorvastatina, os tratamentos com sinvastatina (até 10 μM) e ezetimibe (até 5 μM) mostraram não afetar a viabilidade celular (**Figura 10A**) e a fragmentação de DNA (**Figura 10B**) das células THP-1. Assim, baseado nesses resultados e no efeito dos fármacos no tempo de dobramento, o tempo de tratamento de 24 h e as concentrações de até 10 μM para as estatinas e até 5 μM para a ezetimiba mostraram ser adequados e foram utilizados nos experimentos realizados. Na **Figura 11** pode-se observar o efeito desses tratamentos na morfologia das células THP-1.

Figura 8. Viabilidade celular das células THP-1 após tratamento com atorvastatina. A integridade de membrana das células THP-1 foi analisada por citometria de fluxo após 24h de tratamento com concentrações variáveis de atorvastatina (0 a 20 μM). A região anterior à P1 representa a baixa fluorescência emitida pelas células viáveis (membrana íntegra) e a região P1 representa a alta fluorescência emitida pelas células inviáveis (membrana não íntegra).

Figura 9. Efeito da atorvastatina na fragmentação do DNA das células THP-1. A porcentagem de DNA fragmentado nas células THP-1 foi determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com atorvastatina (0 a 20 μ M). A região P1 representa a baixa fluorescência emitida pelas células com DNA fragmentado e a região posterior a P1 representa a alta fluorescência emitida pelas células com DNA íntegro.

Figura 10. Efeito dos fármacos na integridade de membrana (A) e fragmentação de DNA (B) das células THP-1. A porcentagem de células com membrana íntegra e DNA fragmentado nas células THP-1 foi determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com atorvastatina (0 a 20 μ M), sinvastatina (0 a 10 μ M) e ezetimibe (5 μ M). Dados representam porcentagem de células normalizados pelo controle de veículo (0 μ M)

Figura 11. Morfologia de células THP-1 após tratamento com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba. As células THP-1 foram tratadas com o controle de veículo (A, metanol; B, etanol), atorvastatina a 10 μ M (C), sinvastatina a 10 μ M (D) ou ezetimiba a 5 μ M (E) durante 24 h. Aumento de 40x.

5.1.5. Efeito dos fármacos na integridade de membrana e fragmentação de DNA das células HUVEC

As células HUVEC (1×10^6 células) foram tratadas durante 24h com as diferentes concentrações dos fármacos em estudo. A análise por citometria de fluxo mostrou que as concentrações maiores de atorvastatina (10 e 20 μ M) apresentam 11 e 12%, respectivamente, de perda da integridade de membrana (**Figura 12A**). Da mesma forma, essas concentrações mostraram ter um aumento na fragmentação de DNA de 31 e 41%, quando comparados com o controle de veículo (**Figura 12B**). O tratamento com 10 μ M de sinvastatina mostrou uma viabilidade de 88% das células, entretanto a mesma concentração teve 28% do DNA fragmentado. O tratamento com ezetimibe, assim como

os tratamentos com estatinas em concentrações inferiores a 10 μM , não mostraram perda da integridade nem fragmentação do DNA (**Figura 12**). Assim, as concentrações de atorvastatina e sinvastatina iguais ou superiores a 10 μM parecem ter um efeito citotóxico nas células HUVEC quando tratadas durante 24h. Sendo assim, baseado nesses resultados e no efeito dos fármacos no tempo de dobramento, o tempo de tratamento de 24 h e as concentrações de até 5 μM para as estatinas e até 5 μM para a ezetimiba foram utilizados nos experimentos realizados. Na **Figura 13** pode-se observar o efeito desses tratamentos na morfologia das células HUVEC.

Figura 12. Efeito dos fármacos na integridade de membrana (A) e fragmentação de DNA (B) das células HUVEC. A porcentagem de células com membrana íntegra e DNA fragmentado nas células HUVEC foi determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com atorvastatina (0 a 20 μM), sinvastatina (0 a 10 μM) e ezetimibe (5 μM). Dados representam porcentagem de células normalizados pelo controle de veículo (0 μM).

Figura 13. Morfologia de células HUVEC após tratamento com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba. As células HUVEC foram tratadas com o controle de veículo (A, metanol; B, etanol), atorvastatina a 5 μ M (C), sinvastatina a 5 μ M (D) ou ezetimiba a 5 μ M (E) durante 24 h. Aumento de 20x.

5.2. Validação dos ensaios de qPCR

5.2.1. Análise da eficiência dos ensaios

Foi verificada a eficiência da reação para os ensaios utilizados na quantificação relativa de RNAm neste estudo, sendo consideradas as eficiências entre 90% e 110% como adequadas para a execução dos experimentos. Essas eficiências foram calculadas mediante a realização de curvas padrão utilizando diluições seriadas do cDNA, onde a inclinação da curva (*slope*) determina a eficiência da reação – um *slope* de -3,32 indica 100% de eficiência - (**Tabela 5**).

Tabela 5. Eficiência ensaios utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sequência de referência*	ID do ensaio**	Slope	R²	Eficiência
<i>SELL</i>	NM_000655.4	Hs00174151_m1	- 3,305	0,971	100,7%
<i>SELPLG</i>	NM_003006.3	Hs00356602_m1	- 3,438	0,997	95,4%
<i>ITGA4</i>	NM_000885.4	Hs00168433_m1	- 3,142	0,939	108,5%
<i>ITGAM</i>	NM_001145808.1	Hs00355885_m1	- 3,349	0,992	98,9%
<i>ITGAL</i>	NM_002209.2	Hs00158218_m1	- 3,486	0,974	93,6%
<i>ICAM1</i>	NM_000201.2	Hs99999152_m1	- 3,214	0,989	104,7%
<i>VCAM1</i>	NM_001078.3	Hs01003371_m1	- 3,380	0,932	97,7%
<i>IL1B</i>	NM_000576.2	Hs01555413_m1	- 3, 485	0,992	93,6%
<i>IL6</i>	NM_001003301.1	Hs00985639_m1	- 3,171	0,986	106,7%
<i>IL8</i>	NM_000584.3	Hs00174103_m1	- 3,518	0,998	92,5%
<i>MCPI</i>	NM_002982.3	Hs00234140_m1	- 3,418	0,964	96,1%
<i>TNFA</i>	NM_000594.2	Hs99999043_m1	- 3,142	0,993	108,1%
<i>MMP9</i>	NM_004994.2	Hs00957562_m1	-3,553	0,976	91,1%
<i>NFKB</i>	NM_003998.3	Hs00765730_m1	- 3,394	0,989	97,1%
<i>SELE</i>	NM_000450.2	--	- 3,548	0,969	91,4%
<i>SELP</i>	NM_003005.3	--	- 3,412	0,992	96,34%
<i>NOS3</i>	NM_000603.4	--	- 3,230	0,984	104,0%
<i>UBC[#]</i>	NM_021009.5	--	- 3,331	0,998	99,6%
<i>GAPDH[#]</i>	NM_002046.3	--	- 3,500	0,997	93,1%
<i>B2M[#]</i>	NM_004048.2	--	3,400	0,996	96,8%
<i>HPRT1[#]</i>	NM_000194.1	--	- 3,450	0,991	94,1%
<i>SDHA[#]</i>	NM_004168.2	--	- 3,430	0,986	95,7%
<i>HMBS[#]</i>	NM_000190.3	--	- 3,440	0,994	95,2%

*, Sequência de referência descrita no *National Center of Biotechnology Information* – NCBI; **, Identificação do ensaio de acordo com a biblioteca da Applied Biosystems; #, para os genes endógenos as seqüências de primers e sondas estão descritas na Tabela 2.

5.2.2. Seleção dos genes de referência endógena para cada modelo experimental

Para cada modelo celular (THP-1, HUVEC e CMSP) nas diferentes condições experimentais de tratamento foi selecionado o gene de referência endógena mais adequado, de um total de seis genes constitutivos testados (*UBC*, *GAPDH*, *B2M*, *HPRT1*, *SDHA* e *HMBS*). O programa *Genorm* [<http://medgen.ugent.be/genorm>] foi utilizado para selecionar o gene constitutivo que apresentasse a menor variabilidade para cada modelo, de acordo com valor de M.

Na **Figura 14**, está a representação gráfica da estabilidade dos genes de referência endógena para cada modelo experimental. Pode-se observar que para valores decrescentes de M, o gene constitutivo apresenta uma maior estabilidade, sendo que a análise gerada pelo programa leva à determinação dos dois genes que apresentam maior estabilidade. Desta forma, o gene de referência endógena escolhido para os modelos de células THP-1 e CMSP foi *UBC*, entretanto *HMBS* foi escolhido para o modelo de células HUVEC.

Figura 14. Análise da estabilidade dos genes de referência endógena pelo *software* Genorm. Valores decrescentes de M determinam maior estabilidade dos genes para cada modelo. CMSP; células mononucleares de sangue periférico; *UBC*, ubiquitina C; *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *B2M*, beta-2-microglobulina; *HPRT1*, Hipoxantinafosforibosil-transferase I; *SDHA*, Subunidade A do complexo succinato desidrogenase; *HMBS*, hidroximetil-bilane sintase.

5.3. Efeito de hipolipemiantes sobre as moléculas de adesão em células HUVEC

5.3.1. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica

As células HUVEC foram tratadas com atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba durante 12 e 24 h. Antes da extração de RNA total, as células foram estimuladas durante 6 h com TNF α (10 ng/mL). O tratamento com TNF α mostrou induzir significativamente a expressão de RNAm de todas as moléculas de adesão estudadas (**Figuras 15 a 17**).

A atorvastatina a 5 μ M reduziu a expressão de RNAm do *ICAM1* e *SELP* após 24 h de incubação ($p < 0,05$). Curiosamente, 5 μ M de atorvastatina aumentaram a expressão gênica do *VCAM1* após 12 e 24 h ($p < 0,05$). Entretanto, o uso da atorvastatina não modificou a expressão de RNAm do *SELE* (**Figura 15**).

Figura 15. Efeito da atorvastatina na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como gene de referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM ($n=4-6$) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α a 10 ng/mL ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0 μ M indica tratamentos com o controle de veículo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Os tratamentos com 1 e 5 μM de sinvastatina diminuíram a expressão de RNAm do *ICAM1* após 24 h de incubação ($p < 0,05$). O *SELP* estava reduzido após 24 h de tratamento com 5 μM de sinvastatina ($p < 0,05$). De forma similar ao tratamento com atorvastatina, a expressão do *VCAM1* foi aumentada após 12 e 24 h de tratamento com 5 μM de sinvastatina ($p < 0,05$). A expressão gênica do *SELE* não foi modificada (**Figura 16**).

O tratamento durante 24 h com ezetimiba a 5 μM reduziu a expressão de RNAm do *ICAM1* ($p < 0,05$). Não foram observadas alterações na expressão de RNAm do *VCAM1*, *SELP* ou *SELE* quando tratadas com ezetimiba (**Figura 17**).

Figura 16. Efeito da sinvastatina na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como gene de referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM ($n=4-6$) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com $\text{TNF}\alpha$ a 10 ng/ml ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0 μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 17. Efeito da ezetimiba na expressão gênica de moléculas de adesão em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como genede referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM (n=4-6) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α a 10 ng/ml ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0 μ M indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

5.3.2. Efeito de hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão na superfície de células HUVEC

Na **Figura 18** pode se observar o efeito do tratamento durante 24 h com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC. Ambas as estatinas diminuiram a expressão de ICAM-1 quando utilizadas a 5 μ M. A expressão de P-Selectina foi diminuída pelo tratamento com 1 e 5 μ M de atorvastatina e pelo tratamento com 5 μ M de sinvastatina.

Apesar da diminuição na expressão de RNAm do *ICAM1* observada para o tratamento com ezetimiba, esse efeito não foi confirmado no nível protéico. O tratamento com ezetimiba também não alterou a expressão de P-Selectina (**Figura 18**).

Devido a limitações técnicas, não foi possível determinar a expressão protéica de VCAM-1 e E-Selectina neste estudo.

Figura 18. Efeito da atorvastatina, simvastatina e ezetimiba na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC. Resultados são apresentados como média e SEM (n=4-5) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10 ng/ml (100%). Concentração de 0μM indica tratamento com o controle de veículo. A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram avaliados. *, p<0,05; **, p<0,01.

5.4. Efeito de hipolipemiantes sobre os mediadores de inflamação em células HUVEC

5.4.1. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica

Nas **Figuras 19, 20 e 21** é mostrado, respectivamente, o efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão de RNAm dos genes *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *NFKB*, *MCP1* e *MMP9*.

A atorvastatina a 5 μ M reduziu a expressão gênica de *IL1B* e *IL8* previamente induzidas por TNF α , após 12 e 24 h de tratamento (**Figura 19**). Da mesma forma, *IL8* foi diminuído pelo tratamento por 12 e 24 h com 5 μ M de sinvastatina ($p < 0,05$), entretanto a expressão do *IL1B* foi reduzida também pelo tratamento com 5 μ M de sinvastatina, mas apenas depois de 24 h de exposição (**Figura 20**).

Figura 19. Efeito da atorvastatina na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como gene de referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM (n=4-6) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α a 10 ng/ml (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0 μ M indica tratamentos com o controle de veículo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 20. Efeito da simvastatina na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como gene de referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM (n=4-6) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α a 10 ng/ml (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Figura 21. Efeito da ezetimiba na expressão gênica de mediadores de inflamação em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como gene de referência endógena. Resultados são apresentados como média e SEM (n=4-6) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α a 10 ng/ml (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

O tratamento com ezetimiba reduziu a expressão de RNAm do *IL1B* quando as células HUVEC foram expostas durante 24 h a 5 μ M do fármaco (**Figura 21**).

Os tratamentos hipolipemiantes não alteraram o perfil de expressão de RNAm dos genes *IL6*, *NFKB*, *MCP1* e *MMP9* em células HUVEC previamente estimuladas com TNF α ($p > 0,05$).

5.4.2. Efeito de hipolipemiantes na secreção de citocinas em células HUVEC

Foi avaliado o efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na secreção de citocinas no sobrenadante das culturas celulares, em células HUVEC previamente induzidas com 10 ng/mL de TNF α durante 6 h. Os resultados podem ser apreciados na **Figura 22**.

O tratamento com TNF α induziu satisfatoriamente a expressão de IL-6 e MCP-1, entretanto o estímulo não foi suficiente para induzir a expressão protéica de IL-8.

Apesar de não ter modificado a expressão de RNAm, ambas estatinas diminuíram a secreção de IL-6 e MCP-1 ($p < 0,05$). Por outro lado, a ezetimiba não modificou a concentração dessas citocinas no sobrenadante das culturas celulares.

Os tratamentos hipolipemiantes não afetaram a secreção de IL-8 no sobrenadante das culturas celulares ($p > 0,05$). Por outro lado, em nosso modelo experimental não foram detectáveis níveis quantificáveis de IL-1 β pela tecnologia *milliplex*.

Figura 22. Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na secreção de citocinas em células HUVEC. Valores apresentados como média e SEM (n=5) da concentração das citocinas, em sobrenadante da cultura celular. Concentração de 0μM indica tratamento com o controle de veículo. As células foram estimuladas com 10 ng/mL de TNFα por 6 h e a concentração de citocinas foi avaliada por meio da tecnologia *Milliplex*, na qual foram usados, no mínimo 50 eventos para cada analito, para o cálculo da concentração, usando uma curva padrão. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

5.5. Efeito de hipolipemiantes na expressão de *NOS3* e liberação de óxido nítrico em células HUVEC

O efeito dos hipolipemiantes na expressão de RNAm do *NOS3* está representado na **Figura 23**. Pode se observar que sinvastatina aumentou a expressão gênica do *NOS3* quando usada a concentração de 5 μM, após 24 h de tratamento (p < 0,05). A

atorvastatina não causou dito aumento de maneira significativa, entretanto uma tendência a valores maiores de expressão é apreciada. Por outro lado, a ezetimiba não modificou a expressão gênica de *NOS3* nas células HUVEC.

Figura 23. Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão gênica de *NOS3* em células HUVEC. A expressão de RNAm foi normalizada usando *HMBS* como genede referência endógena. Resultadossão apresentados como média e SEM (n=4-6) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNFα a 10 ng/ml ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Foi também determinada a concentração de NO em sobrenadante de células HUVEC tratadas com atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba. Como observado na **Figura 24**, ambas as estatinas causam um aumento na liberação de NO (p < 0,05), entretanto a ezetimiba não alterou a concentração de NO.

Figura 24. Efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na liberação de óxido nítrico em células HUVEC. Valores apresentados como média e SEM (n=5) da concentração de NO em sobrenadante da cultura celular. Concentração de 0 μM indica tratamento com o controle de veículo. A concentração de NO foi determinada por ozono-quimioluminiscencia usando o analisador de NO Siemers 280. *, p<0,05.

5.6. Papel do óxido nítrico no efeito das estatinas em células HUVEC

Devido a que as estatinas demonstraram aumentar a liberação de NO em células HUVEC, foi investigado o papel desta molécula na mediação do efeito da atorvastatina e da sinvastatina sobre a expressão de moléculas de adesão na superfície celular e na secreção de citocinas. Com essa finalidade foram realizadas duas abordagens experimentais: 1) efeito das estatinas em modelo de células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm; 2) Uso de modelo de células HUVEC incubada com estatinas em co-tratamento com L-NAME.

5.6.1. Efeito das estatinas na expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas em células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm

Inicialmente foi avaliado o sucesso do ensaio de silenciamento gênico através da quantificação de RNAm por qPCR em tempo real. O processo de transfecção foi avaliado pelo uso do controle positivo, siRNAs para o gene da *GAPDH*. Também foi avaliada a eficiência do silenciamento dos três siRNAs para o *NOS3*, cada um de forma isolada e todos eles combinados, como descrito em materiais e métodos (Seção 3.12.1.)

Na **figura 25** pode se observar o sucesso da reação de transfecção demonstrado pela diminuição da expressão de *GAPDH*, superior a 70%. A expressão de RNAm do *NOS3* foi reduzida satisfatoriamente pelos três siRNAs usados de forma isolada e pela mistura deles (redução > 70%), entretanto pode se apreciar uma redução mais pronunciada quando o siRNA NOSHSS-107238 foi utilizado (**Figura 25**).

Figura 25. Avaliação da expressão gênica em células HUVEC transfectadas com siRNA para *GAPDH* e *NOS3*. Observa-se pronunciada inibição da expressão de *GAPDH* no controle (+). Todos os siRNAs para *NOS3*, isolados ou combinados (Mix), diminuem a expressão de RNAm (>70%). Apesar de não observar diferenças significativas na inibição de *NOS3* pelos siRNAs ($p>0,05$), o NOSHSS-107238 mostrou uma inibição mais pronunciada. A expressão gênica foi avaliada usando o *HMBS* como gene de referência endógena e o controle (-) como calibrador.

O uso do modelo de células com *NOS3* silenciado não modificou o efeito das estatinas na expressão protéica de ICAM-1 e P-selectina (**Figura 26**). Da mesma forma, a diminuição da secreção de IL-6 e MCP-1 no sobrenadante de células HUVEC causada pelas estatinas, foi mantida no modelo experimental com *NOS3* silenciado por RNA de interferência (**Figura 27**).

Os experimentos de quantificação protéica na superfície celular e no sobrenadante das culturas celulares foram acompanhados dos controles negativo, controle não transfectado e controle transfectado com um siRNA não específico, como detalhado na seção de materiais e métodos. De acordo com os resultados desses controles, a lipofectamina não afeta a expressão das proteínas estudadas e o uso do siRNA com baixa similaridade com o genoma de mamíferos também não afetou a expressão protéica, demonstrando que não houve efeitos *off target* no nosso modelo.

Figura 26. Efeito da atorvastatina e sinvastatina na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC com *NOS3* silenciado por interferência de RNAm. Valores apresentados como média e SEM (n=3) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10 ng/mL (100%). Concentração de 0 μ M indica tratamento com o controle de veículo. A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram avaliados. Controles C (-), C (NT) e C (NE) representam os controles negativo, controle não transfectado e controle transfectado com um siRNA não específico, respectivamente. Os valores dos controles NT e NE são relativos ao valor de fluorescência do controle negativo (100%).*, p<0,05.

Esses resultados mostram que o efeito das estatinas na modulação das moléculas de adesão e de citocinas estudadas não é mediado pela eNOS. Entretanto, a existência de outros mecanismos capazes de regular a liberação de NO, no endotélio, não nos permite descartar completamente a participação dessa molécula no efeito anti-inflamatório causado pelas estatinas.

Figura 27. Efeito da atorvastatina e sinvastatina na secreção de citocinas, em células HUVEC com NOS3 silenciado por interferência de RNAm. Resultados são apresentados como média e SEM (n=5) da concentração de cada citocina em sobrenadante da cultura celular. Concentração de 0μM indica tratamento com o controle de veículo. A concentração de citocinas foi avaliada por meio da tecnologia Milliplex onde no mínimo 50 eventos para cada analito foram usados para o cálculo da concentração, usando uma curva padrão. Controles C(-), C (NT) e C (NE) representam os controles negativo, controle não transfectado e controle transfectado com um siRNA não específico, respectivamente. *, p<0,05; **, p<0,01.

5.6.2. Efeito das estatinas na expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas em células HUVEC tratadas com L-NAME

Para elucidar se há participação de outros mecanismos moduladores da biodisponibilidade de NO na mediação dos efeitos anti-inflamatórios causados pelas estatinas nas células HUVEC, foi usado um modelo experimental, no qual as células foram incubadas com sinvastatina ou atorvastatina durante 24 h em co-tratamento com o inibidor da síntese de NO, o L-NAME (100 μ M).

Figura 28. Efeito da atorvastatina e sinvastatina na expressão protéica de ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC co-tratadas com L-NAME. Valores são apresentados como média e SEM (n=4-5) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10 ng/ml (100%). A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram computados. As células foram tratadas durante 24h com a concentração indicada da estatina e co-incubadas com L-NAME 100 μ M. *, p<0,05; **, p<0,01.

Em células tratadas com L-NAME foi observado um efeito atenuado das estatinas quando analisada a expressão de ICAM-1 e MCP-1, enquanto o efeito das estatinas sobre a expressão de P-Selectina e IL-6 não foi modificado pelo L-NAME (**Figuras 28 e 29**).

A expressão de ICAM-1 foi diminuída significativamente pela atorvastatina ($p < 0,05$) e pela sinvastatina ($p < 0,01$) a 5 μ M e, apesar de observar também uma diminuição na expressão, o uso de L-NAME parece mostrar um efeito menos acentuado (**Figura 28**). Entretanto não houve diferença significativa na expressão de ICAM-1 entre as células tratadas apenas com as estatinas e aquelas co-incubadas com L-NAME ($p > 0,05$; dados não mostrados).

Resultados similares foram observados para MCP-1, sendo que os tratamentos com sinvastatina e com atorvastatina causaram efeito menos pronunciado e não significativo na diminuição da concentração de MCP-1, no sobrenadante das culturas celulares (**Figura 29**). Novamente, não foram detectadas diferenças significativas entre as células tratadas apenas com as estatinas e aquelas co-incubadas com L-NAME ($p > 0,05$; dados não mostrados).

Esses resultados são sugestivos da participação de mecanismos independentes da eNOS e que também modulam a liberação de NO, nas células HUVEC, como possíveis mediadores da resposta anti-inflamatória exercida pelas estatinas. Entretanto, o L-NAME não reverte completamente o fenótipo anti-inflamatório desses marcadores sugerindo também mecanismo independente do NO, no efeito das estatinas no endotélio vascular.

Figura 29. Efeito da atorvastatina e sinvastatina na secreção de citocinas em células HUVECs co-tratadas com L-NAME. Resultados apresentados como média e SEM (n=5) da concentração de cada citocina em sobrenadante da cultura celular. A concentração de citocinas foi avaliada por meio da tecnologia Milliplex onde no mínimo 50 eventos para cada analito foram usados para o cálculo da concentração, usando uma curva padrão. As células foram tratadas durante 24h com a concentração indicada da estatina e co-incubadas com L-NAME 100 μ M. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

5.7. Efeitos de hipolipemiantes na expressão de micro-RNAs em células HUVEC

Inicialmente, foi realizada a escolha de RNA de referência endógena mais estável em nosso modelo, dentre 4 miRs testados (RNU6B, RNU24, RNU44 e RNU58). Na **Figura 30** são apresentados os resultados e pode se observar que os RNA mais estáveis foram o RNU24 e o RNU58. O RNU24 foi posteriormente usado para os ensaios de qPCR.

Figura 30. Análise da estabilidade dos RNAs de referência endógena pelo *software Genorm*. Valores decrescentes de M determinam maior estabilidade dos genes para cada modelo.

Na **Figura 31**, pode-se observar o efeito da atorvastatina, sinvastatina e ezetimiba na expressão dos miRs 221, 222 e 1303.

O miR-221 estava diminuído após incubação de 24 h com atorvastatina (1 e 5 μ M), sinvastatina (5 μ M) e ezetimiba (5 μ M) ($p < 0,05$).

A expressão do miR-222 foi reduzida apenas pelo tratamento com 5 μ M de atorvastatina ($p < 0,05$), entretanto não foi observado efeito modulatório na expressão do miR-1303 pelos diferentes tratamentos hipolipemiantes ($p > 0,05$).

Figura 31. Efeito da atorvastatina, sinvastatin e ezetimiba na expressão de miR-221, miR-222 e miR-1303 em células HUVEC. A expressão dos miRs foi normalizada usando oRNU24 como RNA de referência endógena. Valores apresentados com média e SEM (n=4) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α 10 ng/ml ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0 μ M indica tratamentos com o controle de veículo.*, p<0,05.

5.8. Efeito de hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão em células THP-1

5.8.1. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica

As células THP-1 foram tratadas com atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba durante 12 e 24 h. Conjuntamente, foram co-incubadas com TNF α (10 ng/mL) durante

12h. O tratamento com TNF α levou a uma discreta indução do RNAm das moléculas de adesão, porém não significativa ($p > 0,05$, **Figuras 32 a 34**).

A atorvastatina reduziu a expressão de RNAm de *SELL* e *ITGA4* após 24 h de tratamento com 5 e 10 μ M, assim como a expressão do *SELPLG* foi reduzida após 24 h de tratamento com 10 μ M do fármaco (**Figura 32**). De forma similar, a sinvastatina reduziu a expressão gênica de *SELL*, *SELPLG* e *ITGA4* (**Figura 33**). As expressões de *SELL* e *ITGA4* foram reduzidas pelo tratamento com 5 e 10 μ M de sinvastatina depois de 24 h de exposição, enquanto o *ITGA4* foi também diminuído no tempo de 12 h quando usada a concentração de 10 μ M. Já a expressão de RNAm do *SELPLG* foi reduzida pelo tratamento com 10 μ M de sinvastatina após 24 h.

O tratamento com ezetimiba diminuiu a expressão gênica do *SELL* ($p < 0,05$, **Figura 34**), mas não de *SELPLG* ou *ITGA4*. As expressões de RNAm do *ITGAL* e do *ITGAM* não foi modificada por nenhum dos tratamentos hipolipemiantes em células THP-1.

Figura 32. Efeito da atorvastatina na expressão gênica em células THP-1. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como genede referência endógena. Resultadossão apresentados como média e SEM (n=4) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNF α 10 ng/mL (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Figura 33. Efeito da sinvastatina na expressão gênica em células THP-1. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como genede referência endógena. Resultadossão apresentados como média e SEM (n=4) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNFα10 ng/mL (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01.

Figura 34. Efeito da ezetimiba na expressão gênica em células THP-1. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como genede referência endógena. Resultadossão apresentados como média e SEM (n=4) dos valores de expressão em relação às células estimuladas com TNFα10 ng/mL (2^{-ΔΔCt}, linha pontilhada no gráfico). Concentração de 0μM indica tratamentos com o controle de veículo. *, p<0,05; **, p<0,01.

5.8.2. Efeito de hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão na superfície de células THP-1

As células THP-1 foram tratadas durante 24 h com atorvastatina, sinvastatina ou ezetimiba e TNF α (10 ng/mL) foi adicionado 12 h antes da quantificação de proteínas por citometria de fluxo. Os efeitos dos tratamentos hipolipemiantes na expressão protéica de moléculas de adesão são mostrados nas **Figuras 35 a 37**.

A atorvastatina (**Figura 35**) e a sinvastatina (**Figura 36**) reduziram a expressão das moléculas de adesão L-Selectina, PSGL-1 e VLA-4 quando tratadas com 10 μ M. Entretanto, as estatinas não modificaram as expressões de LFA-1 e Mac-1 ($p > 0,05$).

Apesar da ezetimiba ter mostrado modular a expressão gênica do SELL, esse efeito não foi confirmado no nível protéico. A ezetimiba não alterou o perfil de expressão protéicas das moléculas de adesão em células THP-1 (**Figura 37**).

Figura 35. Efeito da atorvastatina na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1. Resultados são apresentados com média e SEM (n=4-5) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10ng/ml(100%). Concentração de 0 μ M indica tratamento com o controle de veículo. A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram avaliados. *, $p < 0,05$.

Figura 36. Efeito da sinvastatina na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1. Resultados são apresentados com média e SEM (n=4-5) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10ng/ml(100%). Concentração de 0 μ M indica tratamento com o controle de veículo. A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram avaliados. *, p<0,05.

Figura 37. Efeito da ezetimiba na expressão protéica de moléculas de adesão em células THP-1. Resultados são apresentados com média e SEM (n=4-5) em relação à fluorescência das células estimuladas com TNF α 10ng/ml(100%). Concentração de 0 μ M indica tratamento com o controle de veículo. A expressão protéica foi avaliada por citometria de fluxo e 20.000 eventos foram avaliados. *, p<0,05.

5.9. Efeito de hipolipemiantes na modulação de marcadores de adesão celular e marcadores inflamatórios *in vivo*

5.9.1. Características clínicas dos pacientes hipercolesterolêmicos

Um grupo de 38 indivíduos HC que completaram o protocolo foram incluídos nas análises. As características clínicas são apresentadas na **Tabela 6**. O grupo foi predominantemente do gênero feminino e da etnia caucasiana. Houve uma alta proporção de indivíduos obesos, hipertensos e com histórico de DAC (**Tabela 6**). Todos os indivíduos apresentaram valores dentro da faixa de referência de CK (homem: 38 – 174 U/L; mulher: 26 – 140 U/L) e ALT (homem: 9 – 43 U/L; mulher: 9 – 36 U/L), que indica ausência de patologia muscular e hepática de base, sugerindo que é seguro iniciar o uso dos fármacos hipolipemiantes nesses pacientes. Após os tratamentos não houve indivíduos com valores três vezes acima do limite superior de referência (LSR) de ALT ou acima de 10 vezes do LSR de CK, o qual indica que não houve eventos de hepatotoxicidade ou miotoxicidade, como previamente estabelecido (Martinez e Nascimento, 2005).

5.9.2. Efeito da terapia hipolipemiente no perfil lipídico, PCRus e óxido nítrico em indivíduos hipercolesterolêmicos

Na **Tabela 7**, pode-se observar o efeito das diferentes fases do protocolo terapêutico no perfil lipídico dos indivíduos hipercolesterolêmicos. Os valores de colesterol total, LDL colesterol e apoB diminuíram gradualmente após cada fase do tratamento ($p < 0,001$). Já as concentrações de triglicérides e VLDL colesterol foram reduzidas apenas após o tratamento com sinvastatina e sua associação com ezetimiba

($p=0,001$), mas não foram modificados pela monoterapia com ezetimiba ($p>0,05$) quando comparado com a fase basal. Por outro lado, as concentrações de HDL colesterol e apoAI não foram influenciadas por nenhum dos tratamentos hipolipemiantes empregados neste estudo.

Tabela 6. Características clínicas e demográficas da população estudada.

Variável	n=38
Idade, anos	56,6 $\pm$ 9,7
Gênero (Feminino)	68% (26)
Etnia (Caucasiano)	71% (27)
Obesidade	24% (9)
Menopausa	85% (22)
Índice de massa corporal, kg/cm ²	27,6 $\pm$ 4,6
Hipertensão	61% (23)
Consumo de álcool	21% (8)
Fumantes	18% (7)
Prática de exercício físico	55% (21)
Histórico familiar de DAC	63% (24)
Uso de outros medicamentos	
Antihipertensivos	61% (23)
AAS	8% (3)
Outros	15% (6)
CK (U/L)	114 $\pm$ 41
ALT (U/L)	23 $\pm$ 8

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Variáveis contínuas são apresentadas como média $\pm$ desvio-padrão. DAC, doença arterial coronariana; CK, creatina quinase; ALT, alanina aminotransferase; AAS, Ácido acetilsalicílico.

Apesar da redução dos valores do perfil lipídico observada para os diferentes tratamentos, não houve redução da concentração de PCRus. Da mesma forma, a concentração de NO não foi modificada pelos tratamentos (**Tabela 7**).

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos em indivíduos hipercolesterolêmicos antes e após cada fase do protocolo terapêutico

Parâmetro	Basal	Eze	Sinva	S + E	P
<i>Lipídeos (mg/dL)</i>					
Colesterol total	263 ± 29 ^a	223 ± 30 ^b	202 ± 31 ^c	175 ± 34 ^d	<0,001
HDL-c	59 ± 12	59 ± 11	57 ± 12	57 ± 12	0,414
LDL-c	176 ± 26 ^a	139 ± 27 ^b	120 ± 26 ^c	95 ± 29 ^d	<0,001
VLDL-c	29 ± 11 ^a	26 ± 11 ^{a,b}	25 ± 9 ^b	23 ± 10 ^b	<0,001
Triglicérides	145 ± 57 ^a	129 ± 54 ^{a,b}	124 ± 45 ^b	113 ± 51 ^b	<0,001
ApoAI	145 ± 22	145 ± 22	144 ± 29	145 ± 20	0,848
ApoB	120 ± 19 ^a	101 ± 20 ^b	89 ± 17 ^c	75 ± 19 ^d	<0,001
PCRus (mg/L)	1,06 ± 2,02	0,89 ± 1,59	0,93 ± 1,65	0,82 ± 1,49	0,335
NO (μM)	20,1 ± 9,0	19,4 ± 10,5	21,5 ± 11,1	19,5 ± 8,8	0,350

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio-padrão e foram comparados pelo teste de medidas repetidas de ANOVA. Basal, indivíduos na fase basal do tratamento (*washout*); Eze, indivíduos tratados com 10 mg de ezetimiba durante 4 semanas; Sinva, indivíduos tratados com 10 mg de sinvastatina por 8 semanas; S + E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; ^{a,b,c,d}, letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B. PCRus, proteína C reativa ultra-sensível; NO, óxido nítrico.

5.9.3. Efeito de hipolipemiantes nas moléculas de adesão endoteliais em hipercolesterolêmicos

O efeito das diferentes fases do protocolo terapêutico na expressão de RNAm em CMSP e na concentração plasmática das formas solúveis das moléculas de adesão endoteliais foi avaliado nos pacientes hipercolesterolêmicos.

A expressão gênica do *ICAM1* estava diminuída em CMSP de pacientes hipercolesterolêmicos, quando comparado com a fase basal ($p < 0,05$, **Figura 38**). A expressão de RNAm dos genes *VCAM1*, *SELE* e *SELP* não foi alterada por nenhuma das fases de tratamento (**Figura 38**).

Figura 38. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moléculas de adesão endoteliais em CMSP de hipercolesterolêmicos. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como controle de referência endógena. Dados são apresentados como gráficos de dispersão com barras indicando mediana dos valores de expressão ($2^{-\Delta Ct}$, $n=38$). B, indivíduos na fase basal (*washout*); E, indivíduos tratados com ezetimiba (10 mg/4 semanas); S, indivíduos tratados com sinvastatina (10 mg/8 semanas); S+E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; *, $p<0,05$.

Quando a concentração das formas solúveis das moléculas de adesão foi analisada no plasma dos pacientes hipercolesterolêmicos submetidos às diferentes fases do protocolo terapêutico usando o sistema milliplex, não foram observadas alterações nas concentrações de sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Selectina (**Figura 39**). Entretanto, não foi possível quantificar a forma solúvel de P-Selectina devido a limitações técnicas.

Figura 39. Efeito de hipolipemiantes na concentração plasmática de formas solúveis de moléculas de adesão em hipercolesterolêmicos. Dados são apresentados em barras indicando média e SEM. A concentração das formas solúveis de moléculas de adesão e as citocinas inflamatórias foram determinadas usando metodologia Milliplex. B, indivíduos na fase basal (*washout*); E, indivíduos tratados com ezetimiba (10 mg/4 semanas); S, indivíduos tratados com sinvastatina (10 mg/8 semanas); S+E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; *, $p < 0,05$.

5.9.4. Efeito de hipolipemiantes em moduladores do processo inflamatório em hipercolesterolêmicos

Foram avaliadas a expressão gênica em CMSP e a concentração plasmática de marcadores inflamatórios nos hipercolesterolêmicos após cada fase do protocolo terapêutico.

Na **Figura 40** são apresentados as quantificações de RNAm dos genes *IL1B*, *IL6*, *IL8*, *MCP1*, *TNFA*, *NOS3* e *MMP9*. A expressão dos genes *IL1B*, *IL8*, *MCP1* e *TNFA* foi reduzida pelo uso da terapia combinada de sinvastatina e ezetimiba ($p < 0,05$). Adicionalmente, o *TNFA* foi também diminuído após o tratamento com sinvastatina isolada ($p < 0,05$). A expressão de *IL6*, *NOS3* e *MMP9* não foi alterada pelos tratamentos hipolipemiantes ($p > 0,05$).

Figura 40. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moduladores do processo inflamatório em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como controle de referência endógena. Dados são apresentados como gráficos de dispersão com barras indicando mediana dos valores de expressão ($2^{-\Delta C_t}$, $n=38$). B, indivíduos na fase basal (*washout*); E, indivíduos tratados com ezetimiba (10 mg/4 semanas); S, indivíduos tratados com sinvastatina (10 mg/8 semanas); S+E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; *, $p < 0,05$.

Quando analisadas as concentrações plasmáticas desses marcadores, foi observada uma diminuição na concentração de IL-1 β , IL-8, TNF α e MCP-1 nos pacientes hipercolesterolêmicos após uso da sinvastatina combinada com ezetimiba ($p < 0,05$, **Figura 41**). Entretanto, a sinvastatina e a ezetimiba não alteraram as concentrações dessas moléculas quando usadas como monoterapia. As concentrações plasmáticas de IL-6 e MMP-9 não foram afetadas por nenhum dos tratamentos hipolipemiantes.

Figura 41. Efeito de hipolipemiantes na concentração plasmática de mediadores de inflamação em hipercolesterolêmicos. Dados são apresentados em barras indicando média e SEM. A concentração das formas solúveis de moléculas de adesão e as citocinas inflamatórias foram determinadas usando metodologia Milliplex. B, indivíduos na fase basal (*washout*); E, indivíduos tratados com ezetimiba (10 mg/4 semanas); S, indivíduos tratados com sinvastatina (10 mg/8 semanas); S+E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; *, $p < 0,05$.

5.9.5. Efeito de hipolipemiantes na expressão de RNAm de moléculas de adesão monocitárias em hipercolesterolêmicos

Foi avaliado o efeito dos diferentes esquemas terapêuticos na expressão de RNAm dos genes que codificam para as moléculas de adesão monocitárias L-Selectina (*SELL*), PSGL-1 (*SELPLG*), VLA-4 (*ITGA4*), LFA-1 (*ITGAL*) e Mac-1 (*ITGAM*), em CMSP. Os resultados são apresentados na **Figura 42**.

A expressão de RNAm do *ITGAL* foi reduzida pelo tratamento com sinvastatina combinado com ezetimiba, quando comparada com qualquer outra fase do protocolo terapêutico ($p < 0,01$). As expressões do *ITGAM* e *SELPLG* foram reduzidas pela terapia combinada, quando comparadas com a fase basal de tratamento e a fase de tratamento com ezetimiba ($p < 0,05$). As expressões de RNAm do *SELL* e *ITGA4* não foram alteradas após as diferentes fases do protocolo terapêutico (**Figura 42**).

Figura 42. Efeito de hipolipemiantes na expressão gênica de moléculas de adesão monocitárias em indivíduos hipercolesterolêmicos. A expressão de RNAm foi normalizada usando *UBC* como controle de referência endógena. Dados são apresentados como gráficos de dispersão com barras indicando mediana dos valores de expressão ($2^{-\Delta C_t}$, $n=38$). B, indivíduos na fase basal (*washout*); E, indivíduos tratados com ezetimiba (10 mg/4 semanas); S, indivíduos tratados com sinvastatina (10 mg/8 semanas); S+E, indivíduos tratados com 10 mg de cada fármaco durante 4 semanas; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos dos inibidores da síntese e absorção do colesterol sobre a expressão de moléculas de adesão e mediadores do processo inflamatório em modelos experimentais *in vitro* de endotélio vascular e de monócitos, assim como em pacientes hipercolesterolêmicos como modelo de estudo *in vivo*. Os resultados mostram claros efeitos benéficos das estatinas como inibidores do processo de adesão celular, demonstrado pela redução de moléculas de adesão tanto no endotélio como nos monócitos. Também houve uma redução das vias de sinalização celular do endotélio mediado pela redução de citocinas em resposta ao tratamento com as estatinas. Por outro lado, a inibição da absorção do colesterol também representa um fator benéfico, quando ela é combinada ao uso da sinvastatina, como demonstrado nos indivíduos hipercolesterolêmicos onde atua reduzindo a expressão de moléculas de adesão celular e também inibindo a secreção de marcadores pro-inflamatórios.

No nosso modelo experimental de endotélio vascular *in vitro*, as estatinas mostraram reduzir o perfil de adesão induzido pelo TNF α , como demonstrado pela redução da expressão de RNAm e protéica de P-Selectina e ICAM-1. Esses resultados confirmam a existência de efeitos pleiotrópicos atribuídos às estatinas sobre a função endotelial. Os efeitos das estatinas no endotélio vascular têm sido avaliados por vários estudos usando diversos modelos *in vitro*, razão pela qual os resultados podem diferir entre um modelo e outro.

A atorvastatina demonstrou diminuir a expressão de RNAm e da proteína P-Selectina em células HUVEC com um processo inflamatório induzido por partículas finas (Zhao, Xie *et al.*, 2011). Similarmente, uma redução da expressão de P-selectina foi relatada anteriormente em células HUVEC induzidas com TNF α e histamina quando

tratadas com sinvastatina a 1 μ M (Eccles, Sowden *et al.*, 2008). Assim como a P-Selectina pode mediar a interação monócito-endotélio, esta molécula pode também facilitar a interação das plaquetas com o endotélio, já que ela é também expressada na superfície das plaquetas. As estatinas também mostraram reduzir a expressão de P-Selectina na superfície plaquetária, como demonstrado recentemente em ratos hiperlipidêmicos tratados com atorvastatina (Lin, Shen *et al.*, 2013) e pela pravastatina num sistema *in vitro* de perfusão (Hamada, Sugimoto *et al.*, 2011), demonstrando que o efeito benéfico das estatinas na função endotelial não é exercido apenas diretamente na superfície endotelial, mas também através da diminuição da ativação do endotélio por meio da interação com as plaquetas ativadas.

Os dados referentes a efeitos das estatinas na expressão de ICAM-1 têm se mostrado menos conclusivos. Embora alguns estudos tenham mostrado dados similares aos apresentados neste trabalho com a diminuição de ICAM-1 quando células HUVEC foram tratadas com uma estatina (Landsberger, Wolff *et al.*, 2007), outros trabalhos relataram que a expressão gênica e protéica desta molécula não foi afetada (Eccles, Sowden *et al.*, 2008; Yang, Huang *et al.*, 2012), ou inclusive, foi aumentada (Stach, Nguyen *et al.*, 2012).

Esses resultados, que parecem ser contraditórios, podem ser produto das diferenças no modelo experimental utilizado ou do tipo de estatina usado em cada estudo. Por exemplo, a cerivastatina, mas não a sinvastatina, reduziu a expressão de ICAM-1 induzida por TNF α na superfície de células HUVEC (Landsberger, Wolff *et al.*, 2007). Por outro lado, a atorvastatina, sinvastatina e rosuvastatina não reduziram ICAM-1 em células HUVEC estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (Yang, Huang *et al.*, 2012), que representa um modelo mais agressivo de inflamação aguda.

Apesar das diferenças observadas nos trabalhos que estudaram o efeito das estatinas na expressão de ICAM-1, estudos funcionais dão suporte à idéia de que as estatinas reduzem a interação dos monócitos com o endotélio vascular. Como observado para o tratamento com atorvastatina, no qual células HUVEC estimuladas com TNF α e previamente tratadas com a estatina diminuíram a captação de células THP-1, sob condições de fluxo controladas in vitro (Bernot, Benoliel *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados sobre o efeito das estatinas na expressão protéica de P-Selectina e ICAM-1 em células HUVEC se correlacionam com os resultados de expressão de RNAm. Entretanto, a redução na expressão gênica do *ICAM1* após tratamento com ezetimiba não foi observado no nível protéico. Outros mecanismos não avaliados neste estudo podem estar atuando a nível pós-transcricional ou traducional/pós-traducional e que mitiga o efeito observado no nível transcricional. Desta forma, estudos adicionais são necessários para indagar nos mecanismos que levam à ezetimiba a regular a expressão dessa molécula de adesão apenas no nível de RNAm, mas não da proteína.

No nosso estudo também foi observado um aumento de RNAm do *VCAM1* causado pelas estatinas, porém não foi possível confirmar este efeito no nível protéico devido a dificuldades técnicas. Apesar de que um aumento de *VCAM1* parece ser oposto aos efeitos anti-inflamatórios propostos para as estatinas, esta característica tem sido observada em outros trabalhos. Por exemplo, a atorvastatina a 1 μ M (Bernot, Benoliel *et al.*, 2003) e a sinvastatina a 10 μ M (Rossi, Rouleau *et al.*, 2010) aumentaram a expressão de VCAM-1 em células HUVEC. Apesar do aumento na expressão de VCAM-1 e também de ICAM-1, foi observado um rearranjo na distribuição dessas moléculas de adesão na superfície celular que atenua o fenótipo de adesão das células

(Bernot, Benoliel *et al.*, 2003). Por outro lado, um trabalho que avaliou os efeitos das estatinas em culturas estáticas e em condições de fluxo demonstrou que o aumento de VCAM-1 causado pelo tratamento com sinvastina era revertido quando o experimento era realizado em condições de fluxo (Rossi, Rouleau *et al.*, 2010). O resultado relatado anteriormente é mais uma evidencia de que os efeitos das estatinas no endotélio vascular observados em modelos *in vitro* podem variar de acordo com as condições usadas em cada modelo experimental.

O efeito das estatinas na expressão de E-Selectina tem sido menos estudado. A sinvastatina a 1 μ M reduziu a expressão de E-Selectina em células HUVEC estimuladas com TNF α (Eccles, Sowden *et al.*, 2008). Em nosso estudo, não foi detectada alteração da expressão de RNAm do *SELE* em resposta aos tratamentos hipolipemiantes, entretanto não foi possível realizar a quantificação da proteína na superfície das HUVEC devido a dificuldades técnicas. É interessante não ter observado um comportamento similar àquele da P-Selectina em nosso trabalho, já que são duas moléculas com funções similares regulando as interações iniciais com os monócitos no endotélio por sua interação com o PSGL-1, entretanto cabe salientar que a regulação transcricional e sua exposição na superfície celular dessas duas moléculas ocorrem por mecanismos diferentes. Enquanto a P-Selectina é armazenada em vesículas intracelulares na célula endotelial e responde a estímulos pro-inflamatórios por uma via regulada por RhoA e Rac, a E-Selectina responde a estímulos inflamatórios por uma via que envolve a participação de NF κ B e a proteína kinase p38 mitogeno-ativada (p38MAPK) (Cernuda-Morollon e Ridley, 2006). Desta forma, é necessária a quantificação na superfície celular da célula da E-Selectina para ter dados mais

conclusivos dos efeitos da terapia hipolipemiante sobre a expressão dessa molécula no endotélio vascular.

Neste estudo, quando analisado o efeito dos hipolipemiantes na secreção de citocinas, foi observada uma diminuição de IL-6 e MCP-1 em resposta às estatinas em células HUVEC. Entretanto, esses resultados observados no sobrenadante das células não se correlacionaram com o observado no nível transcricional, no qual não foram observadas modificações na expressão de RNAm pelo tratamento com estatinas. Vários outros mecanismos regulatórios poderiam explicar essa inconsistência na modulação das estatinas sobre as citocinas IL-6 e MCP-1, dentre eles alguns mecanismos pós-transcricionais como, por exemplo, a estabilidade da molécula de RNAm no citoplasma da célula. Também é possível a existência de mecanismos pós-traducionais, pelos quais as proteínas poderiam estar sujeitas a certas modificações químicas que poderiam diminuir sua estabilidade intracelular, antes de ser secretada ou mesmo no ambiente extracelular. Finalmente, as estatinas poderiam estar influenciando os mecanismos pelos quais essas citocinas são secretadas, levando a uma retenção intracelular das proteínas. Entretanto, todas essas hipóteses são meramente especulativas e outros estudos devem ser conduzidos para verificar os mecanismos envolvidos na redução da secreção dessas citocinas observadas em nosso modelo.

Um estudo recente propõe que é possível um envolvimento das estatinas na retenção e redistribuição das citocinas no endotélio vascular. Como observado em células HUVEC estimuladas com IL-1 β , onde a atorvastatina levou a um acúmulo de MCP-1 nas células endoteliais (Hol, Otterdal *et al.*, 2012). Análises posteriores usando microscopia confocal mostraram que MCP-1, que estava presente em vesículas citoplasmáticas pequenas nas células estimuladas com IL-1 β , continuava na mesma

localização quando era pré-tratada com atorvastatina e, além disso, ela era redistribuída em corpos multivesiculares no citoplasma da célula, sugerindo uma possível degradação por uma via endocítica. Os autores reproduziram esses resultados para sinvastatina e a fluvastatina, porém quando utilizaram a pravastatina esses efeitos não foram observados. Isso também mostra, como comentado anteriormente, que os efeitos das estatinas no endotélio vascular podem diferir dependendo do tipo de estatina utilizado. Nesse caso em particular, a atorvastatina, sinvastatina e fluvastatina são moléculas lipossolúveis, entretanto a pravastatina é hidrossolúvel, o que poderia explicar as diferenças observadas no trabalho de Hol e colaboradores.

Estudos anteriores avaliaram os efeitos das estatinas no endotélio vascular. Um trabalho recente mostrou que a expressão de IL-6 e MCP-1, mas não IL-8, é reduzida na parede da aorta de pacientes previamente tratados com concentrações crescentes (0, 20 e 40 mg/dia) de atorvastatina ou sinvastatina durante pelo menos 6 semanas (Van Der Meij, Koning *et al.*, 2013). Também foi relatada uma diminuição na secreção de IL-6 e MCP-1 pela atorvastatina em células endoteliais no estado basal (sem estímulo) (Zineh, Luo *et al.*, 2006). Por outro lado, a sinvastatina não alterou a expressão de MCP-1 em células endoteliais estimuladas com inositol fosfato (Lee, Lee *et al.*, 2012)

Foi também observada uma redução de IL-6 e MCP-1 secretadas quando foi utilizada a estatina do tipo rosuvastatina, em células HUVEC estimuladas com TNF α (Kim, Ahn *et al.*, 2007). Recentemente também foi observada a diminuição da secreção dessas citocinas, no sobrenadante de cultura celular quando as células HUVEC foram tratadas com atorvastatina 0,1 μ M durante 24 h (Korybalska, Kawka *et al.*, 2012). Esses dois trabalhos também relataram a diminuição de IL-8 secretada no sobrenadante, entretanto cabe assinalar que o estímulo utilizado foi mais agressivo que o usado neste

estudo, com um maior tempo de indução com TNF α e a co-incubação com IL-1 β , respectivamente. De fato, o estímulo que utilizamos (TNF α durante 6h) foi suficiente para aumentar a expressão de RNAm do *IL8*, entretanto não promoveu o aumento na proteína secretada. Este resultado pode explicar a ausência de efeito regulador das estatinas a nível protéico, na presença de diminuição da expressão gênica, causado por sinvastatina e atorvastatina no presente trabalho.

Outra citocina com um importante papel no processo inflamatório é a IL-1 β . No presente estudo, foi observada a redução da expressão de RNAm do *IL1B* causada pelas estatinas e também pela ezetimiba, entretanto não foram encontrados concentrações detectáveis da proteína secretada no sobrenadante das culturas celulares pela técnica utilizada. É possível que a indução durante 6 h com TNF α (10 ng/ml) não foi suficiente para elevar a secreção desta citocina nas células HUVEC. Concentrações de IL-1 β costumam ser muito baixas, principalmente em modelos como o nosso que não usam um estímulo agressivo de indução do processo inflamatório, pelo qual uma diminuição do volume do meio de cultura utilizado também é uma alternativa para encontrar valores quantificáveis no nosso modelo experimental.

De qualquer forma, a diminuição da expressão gênica do *IL1B* causada pelo tratamento com ezetimiba é um dado importante que precisa ser abordado em estudos futuros, pois representa uma evidência de possíveis efeitos pleiotrópicos atribuíveis à inibição da absorção do colesterol. Os dados da literatura são limitados nesse aspecto, entretanto é possível observar o efeito anti-inflamatório da ezetimiba em um trabalho recentemente publicado em que monócitos de pacientes hipercolesterolêmicos estimulados com LPS e tratados com a ezetimiba associada a uma dose baixa de

sinvastatina causou uma redução da secreção de IL-1 β semelhante ao de uma dose alta da mesma estatina (Moutzouri, Tellis *et al.*, 2012).

Poucos trabalhos têm avaliado os efeitos das estatinas sobre IL-1 β no endotélio vascular usando modelos *in vitro*. As estatinas sinvastatina, fluvastatina, pravastatina e cerivastatina reduziram a expressão de RNAm e a secreção de IL-1 β em células de endotélio vascular primárias estimuladas com aceto miristato de forbol (PMA) (Inoue, Goto *et al.*, 2000), segundo os autores por um via dependente de PPAR α . Recentemente, foi demonstrada uma diminuição de IL-1 β em células endoteliais provenientes de artéria aorta de ratos causada pelo tratamento com lovastatina (Tian, Qiu *et al.*, 2012).

Outra molécula avaliada neste estudo foi MMP-9. Apesar de que a maioria dos trabalhos que investigam o papel dessa molécula na função endotelial tem-se focado nas ações degradativas na matrix extracelular, ela também tem propriedades que podem ser vinculadas ao processo inflamatório (Chow, Cena *et al.*, 2007). Alguns trabalhos têm mostrado um efeito inibitório das estatinas sobre a expressão de MMPs no endotélio vascular. Como em células endoteliais humanas e provenientes da aorta de bovinos ativadas com PMA, onde 1 μ M de sinvastatina reduziu a expressão e secreção de MMP-9 (Massaro, Zampolli *et al.*, 2010). Além disso, a atorvastatina e a sinvastatina, mas não a pravastatina, em células HUVEC, atenuaram a indução de MMP-9 causada pelo estímulo com PMA (Izidoro-Toledo, Guimaraes *et al.*, 2011). Os autores mostraram que essas estatinas, além de diminuir a expressão de MMP-9 nas células, também levam a uma atividade diminuída da enzima. No nosso estudo, não foram detectadas diferenças na expressão gênica de *MMP9* nas células HUVEC estimuladas com TNF α quando tratadas como as estatinas ou ezetimiba, entretanto uma importante limitação do nosso

estudo é não ter avaliado sua concentração protéica nesse modelo ou, mais importantemente, sua atividade através de ensaios de zimografia.

Nós não observamos alteração no perfil de expressão de RNAm do *NFKB* nas células HUVEC tratadas com hipolipemiantes. Porém, é importante assinalar que o estudo quantitativo do RNAm não necessariamente representa a expressão da proteína ou a atividade transcricional do NFκB, que tem se mostrado um importante fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de moléculas adesão e citocinas no endotélio vascular (Van Gils, Zwaginga *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm mostrado que as estatinas podem modular a atividade transcricional do NFκB em diferentes modelos experimentais. A fluvastatina reduziu a ativação do NFκB em células do epitélio do túbulo renal provenientes de ratos, por uma via dependente de p38MAPK (Gao, Wu *et al.*, 2012). Na linhagem de macrófagos RAW264.7, a sinvastatina inibiu a degradação de IκB-α e aumentou a atividade do NFκB induzidos pelo LPS (Leung, Wang *et al.*, 2011). Tratando-se do endotélio vascular, um trabalho recente mostrou que a pitavastatina suprime a ativação do NFκB induzida por apoCIII em células endoteliais provenientes da veia safena humana (Zheng, Azcutia *et al.*, 2013).

Interessantemente, foi observado que o tratamento com ezetimiba (0,6 mg/Kg/dia) levou a uma redução da atividade do NFκB em leucócitos do sangue periférico provenientes de coelhos ateroscleróticos (Gomez-Garre, Munoz-Pacheco *et al.*, 2009). O resultado apresentado nesse trabalho leva a pensar numa possível conexão entre a biodisponibilidade de colesterol e a atividade transcricional do NFκB. Um possível mecanismo para a regulação da atividade do NFκB dependente do conteúdo intracelular de colesterol é através da regulação pela RIP140 (do inglês *receptor-*

interacting protein 140), um receptor nuclear que se caracteriza por atuar como co-regulador de diversos fatores de transcrição, dentre eles o NFκB (Zschiedrich, Hardeland *et al.*, 2008). Recentemente foi descrito que o potencial pro-inflamatório do RIP140 é regulado pelo conteúdo de colesterol intracelular através da regulação da família de miRs-33 (Ho, Chang *et al.*, 2011), composta por dois miRs (miR33a e miR33b) sintetizados nas regiões intrônicas das SREBFs que controlam o *pool* intracelular do colesterol. Desta forma, a diminuição do conteúdo intracelular do colesterol, causada pelas intervenções farmacológicas, resulta em aumento na síntese das SREBFs e dos miRs-33 que, tendo como alvo o RNAm do *RIP140*, leva a uma diminuição da proteína, o que consequentemente poderia resultar em diminuição da atividade do NFκB.

As estatinas, mas não a ezetimiba, mostraram induzir a liberação de NO, no nosso modelo experimental de células HUVEC, no qual também foi observado um aumento da transcrição do *NOS3*. Apesar de nossos dados apresentarem alguma correlação na regulação de *NOS3* e a liberação de NO, tem sido sugerido que a modulação da atividade da eNOS e liberação de NO pelas estatinas é mais dependente de modificações pós-traducionais do que a modulação da expressão gênica. Entretanto, resultados similares aos nossos, além de modificações pós-traducionais, foram observados em um trabalho recente que avaliou a estatina do tipo fluvastatina em células endoteliais em cultura (Aoki, Nakano *et al.*, 2012). Da mesma forma que a fluvastatina no trabalho de Aoki e colaboradores, a sinvastatina (Rossoni, Wareing *et al.*, 2011) também mostrou causar a fosforilação do resíduo Ser¹¹⁷⁷ da eNOS num processo regulado pela PKB/*akt*, que resulta na ativação da enzima e uma maior produção de NO (Fulton, Gratton *et al.*, 1999).

O importante papel que o NO tem no endotélio vascular, através da sua função vasodilatadora, nos levou a investigar se os efeitos benéficos como a inibição de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias causados pelas estatinas no endotélio vascular, observados nesse e outro trabalhos, podem ser modulados por esta molécula.

Com base nos resultados obtidos no modelo de células HUVEC com *NOS3* silenciado, pode-se concluir que o efeito das estatinas na modulação das moléculas de adesão e de citocinas estudadas não é mediado pela eNOS. Entretanto, há outros mecanismos capazes de regular a liberação de NO, no endotélio, o qual não permite descartar completamente a participação desta molécula no efeito anti-inflamatório causado pelas estatinas. A liberação de NO, no endotélio, pode também ser modulada pela iNOS e as estatinas podem modular a expressão desta enzima, como recentemente demonstrado em cortes histológicos de coração de ratos tratados com rosuvastatina (Zaitone e Abo-Gresha, 2012). Desta forma, para elucidar se há participação de outros mecanismos moduladores da biodisponibilidade de NO na mediação dos efeitos anti-inflamatórios causados pelas estatinas nas células HUVEC, foi usado um modelo experimental depletado de NO por meio do uso do inibidor da síntese, L-NAME.

Quando usado o L-NAME em co-tratamento com as estatinas nas células HUVEC, foi observado um efeito atenuado na redução de ICAM-1 e MCP-1, porém não houve diferenças estatísticas entre células tratadas com as estatinas com ou sem L-NAME. Esses resultados são sugestivos da participação de mecanismos independentes da eNOS e que também modulam a liberação de NO, nas células HUVEC, como possíveis mediadores da resposta anti-inflamatória exercida pelas estatinas. Entretanto, o L-NAME não reverte completamente o fenótipo anti-inflamatório desses marcadores

sugerindo também mecanismo independente do NO, no efeito das estatinas no endotélio vascular.

O papel do NO na modulação de marcadores inflamatórios pelas estatinas tinha sido estudado em modelos animais deficientes de *NOS3*. Como em camundongos *knockout* para *NOS3*, onde atorvastatina não reduziu a ativação de NFκB ou o tamanho da região infartada em miocárdio, comparados com camundongos do tipo selvagem (Ye, Martinez *et al.*, 2008). Da mesma forma, a rosuvastatina não conseguiu atenuar a interação entre leucócito e endotélio nas vênulas peri-intestinais de camundongos deficientes de *NOS3*, como foi observado nos camundongos que tinham o gene presente (Stalker, Lefer *et al.*, 2001). Entretanto, modelos animais deficientes do *NOS3* representam um modelo mais agressivo na funcionalidade do endotélio vascular que os utilizados em nosso estudo. Por outro lado, alguns dos efeitos pleitrópicos das estatinas têm sido observados também em modelos animais deficientes de eNOS, como em camundongos tratados com atorvastatina, onde o tratamento inibiu a ativação plaquetária de forma similar aos camundongos não mutados, demonstrando efeitos independentes da eNOS (Ni, Peleg *et al.*, 2012).

No presente trabalho, foi também analisado o efeito dos hipolipemiantes no perfil de expressão de três miRs, relatados como importantes moléculas na função endotelial. Os miRs 221 e 222 têm mostrado participar na progressão de doenças cardiovasculares (Pan, Lu *et al.*, 2010), como observado em lesões da artéria carótida após angioplastia, onde sua expressão estava incrementada (Liu, Cheng *et al.*, 2009). Da mesma forma, os miRs 221 e 222 estavam aumentados em células progenitoras do endotélio provenientes de pacientes com doença arterial coronariana (Minami, Satoh *et al.*, 2009) e, nesse grupo de pacientes, o tratamento por 12 meses com atorvastatina,

mas não a pravastatina, diminuiu a expressão de ambos miRs. Esses resultados estão de acordo com a diminuição do miR-221 e miR-222 causada pelas estatinas neste trabalho.

Além disso, uma importante extensão do nosso estudo é avaliação do efeito da ezetimiba nesses miRs e, a diminuição da expressão observada para o miR-221 é um importante indicador de efeitos pleiotrópicos atribuíveis ao tratamento com esse fármaco. Um estudo recente mostrou que a ezetimiba inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos induzida por PMA e os autores sugerem que um dos mecanismos envolvidos poderia ser a regulação dos miRs 155, 222, 424 e 503 pela ezetimiba nesse modelo celular (Munoz-Pacheco, Ortega-Hernandez *et al.*, 2012). Apesar de que nós não observamos diferenças na expressão do miR-222 em células HUVEC tratadas com ezetimiba, cabe salientar as diferenças nos modelos celulares utilizados.

Os miRs são diferencialmente expressos dependendo do tecido onde eles são estudados. Além disso, a capacidade de cada miR ter múltiplos alvos de RNAm e, por sua vez, a característica de que um RNAm pode ser regulado por diversos miRs dificulta a interpretação das vias metabólicas envolvidas no processo estudado. Entretanto, ferramentas de bioinformáticas e estudos prévios (Pan, Lu *et al.*, 2010) auxiliam na escolha de genes candidatos que são alvos dos miRs estudados. Por exemplo, p27 (Kip1) e p57 (Kip2) são dois potenciais genes alvos dos miR-221 e miR-222 que demonstraram estar envolvidos no mecanismo pelo qual esses miRs modulam a proliferação de células musculares lisas no endotélio (Liu, Cheng *et al.*, 2009). Entretanto, o miR-221 e miR-222 têm demonstrado regular, de forma indireta e por mecanismos ainda não completamente descritos, a expressão de eNOS e a liberação de NO no endotélio vascular, como observado em células HUVEC transfectadas com esses

miRs após silenciamento do DICER (Rippe, Blimline *et al.*, 2012). Desta forma, há uma íntima relação na regulação desses miRs pelos tratamentos hipolipemiantes avaliados e a regulação da liberação de NO.

Por outro lado, o miR-1303 que foi identificado como um potencial regulador do *NOS3* por ferramentas de bioinformática, não foi afetado por nenhum dos tratamentos hipolipemiantes. Esse resultado é sugestivo de que a regulação da expressão de *NOS3* e do aumento na liberação de NO observada para o tratamento com estatinas é independente da regulação do miR-1303.

Neste estudo, foi também avaliado o efeito dos hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão monocitárias, usando como modelo de estudo as células THP-1 estimuladas com TNF α . Os resultados sugerem que as estatinas podem levar a uma diminuição da interação monócito-endotélio através da diminuição do processo de *rolling*, mediado pela redução da expressão de RNAm e proteínas de L-Selectina e PSGL-1. Como mostrado em nosso modelo experimental de monócitos, esses fármacos também podem reduzir a adesão estável ao endotélio pela redução da expressão de VLA-4.

Poucos estudos têm avaliado o efeito dos hipolipemiantes na expressão de moléculas de adesão nos monócitos e, certamente, o uso de modelos experimentais *in vitro* para avaliar o efeito isolado dos fármacos é praticamente inexistente.

De forma concordante com nossos dados, uma redução de L-Selectina foi observada em monócitos provenientes de pacientes normolipidemicos com DAC tratados com atorvastatina (10 a 40 mg/dia) durante pelo menos 8 semanas, comparado com aqueles pacientes sem tratamento (Walter, Suselbeck *et al.*, 2010). Naquele

trabalho foi também observada uma redução de LFA-1 e Mac-1, que não foram observadas no nosso modelo experimental *in vitro*. Entretanto, cabe salientar que esse efeito pode responder ao uso do modelo experimental de humanos, onde as moléculas de adesão expressas no monócito estão interagindo com as moléculas presentes no endotélio. Sendo assim, a redução da expressão LFA-1 e Mac-1, em resposta ao tratamento com estatinas, pode ser dependente dos efeitos das estatinas na função endotelial. LFA-1 e Mac-1 interagem com ICAM-1 presente no endotélio e, dados provenientes desse estudo e outros trabalhos discutidos anteriormente têm mostrado que as estatinas reduzem a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais. Concordantemente, uma redução da expressão de RNAm de LFA-1 e Mac-1 foi observada em nosso modelo *in vivo*, entretanto esses resultados serão discutidos posteriormente.

Também usando um modelo celular proveniente de um sistema biológico *in vivo*, um aumento de L-Selectina foi observado em monócitos incubados com LDL nativa provenientes de pacientes com DAC tratados com 40 mg/dia de sinvastatina por 12 semanas (Serrano, Pesaro *et al.*, 2009) e em monócitos provenientes de pacientes hemodialisados tratados com 20 mg/dia de atorvastatina durante 6 meses (Stavroulopoulos, Petras *et al.*, 2010). Os autores explicaram que a expressão aumentada de L-Selectina após tratamento com a estatina era devido a que essa molécula desaparece da superfície dos leucócitos uma vez que eles interagem com seu receptor específico no endotélio e, desta forma uma expressão reduzida de L-Selectina representa o monócito ativado e as estatinas reverterem este processo. O resultado oposto observado em nosso modelo *in vitro*, no qual uma diminuição de RNAm e proteína após tratamento com estatinas foi observada, pode ser explicado pelo fato de nosso modelo

carecer dos receptores endoteliais existente em modelos *in vivo*, já que com este modelo nós visamos estudar os efeitos diretos dos hipolipemiantes na expressão das moléculas de adesão em células THP-1. Além disso, o receptor endotelial para a L-Selectina é o PSGL-1, que também é expresso em monócitos (Huo e Xia, 2009) e, como relatado nesse estudo, a expressão de PSL-1 foi reduzida pelo tratamento com estatinas, o qual poderia explicar a expressão diminuída de L-Selectina em nosso modelo de estudo *in vitro*.

Informações sobre o efeito da terapia hipolipemiante na expressão de VLA-4 é limitada e inclui apenas alguns trabalhos usando diferentes modelos celulares. Neutrófilos provenientes de pacientes com anemia de células falciformes reduziram a adesão ao endotélio em resposta ao tratamento com sinvastatina (Canalli, Proenca *et al.*, 2011), e linhagens celulares de câncer de ovário também reduziram a adesão às células mesoteliais do peritônio (Wagner, Lob *et al.*, 2011). Em ambos trabalhos, a adição de anticorpos para VLA-4 inibiram a adesão celular, demonstrando um importante papel dessa molécula de adesão em aqueles modelos experimentais e, como sugerido pelos autores mas não demonstrado experimentalmente, a sinvastatina poderia reduzir sua expressão.

Neste estudo, foram também avaliados os efeitos da sinvastatina e da ezetimiba em condições experimentais *in vivo*, usando pacientes hipercolesterolêmicos que tem indicação de tratamento hipolipemiante como modelo de estudo. A influência dos tratamentos no perfil lipídico e marcadores inflamatórios foram avaliados no plasma dos pacientes, entretanto para o estudo da expressão gênica foram usadas CMSP como modelo de estudo. As CMSP têm sido largamente utilizadas para avaliar o efeito de hipolipemiantes na expressão gênica em humanos, devido a que sua obtenção não

requer de métodos invasivos e reduz ao mínimo o risco dos pacientes incluídos na pesquisa. Certamente, o uso das CMSP não necessariamente irá refletir a regulação da expressão gênica de todos os tecidos, podendo os hipolipemiantes exercer sua função de forma diferenciada em diferentes tecidos. De qualquer forma, as CMSP representam um modelo de estudo válido, que outorga uma aproximação do que pode estar acontecendo em tecidos diferentes quando são estudados pacientes *in vivo*, mas as conclusões a partir desse modelo de estudo devem levar em conta as limitações do modelo. Nosso grupo de pesquisa tem usado o modelo de CMSP para avaliar o efeito de hipolipemiantes, incluindo estudos onde o alvo da pesquisa são marcadores cuja funcionalidade está principalmente nos tecidos hepático ou intestinal (Rodrigues, Curi *et al.*, 2006; Arazi, Genvigir *et al.*, 2008; Genvigir, Rodrigues *et al.*, 2010; Cerda, Genvigir, Rodrigues *et al.*, 2011; Cerda, Genvigir, Willrich *et al.*, 2011). Tratando-se do nosso estudo, as CMSP podem ser consideradas um bom modelo de estudo para avaliar o efeito de hipolipemiantes nas moléculas de adesão monocitárias, entretanto algumas limitações podem ser encontradas quando é avaliado o efeito desses fármacos na função endotelial.

Nos pacientes hipercolesterolêmicos, o tratamento com 10 mg de sinvastatina foi mais efetivo na melhora do perfil lipídico que o tratamento com 10 mg ezetimiba isolada, baseado na redução dos valores de colesterol total, LDL colesterol e apoB. Da mesma forma, a associação da sinvastatina com a ezetimiba teve um efeito maior na redução desses parâmetros que os tratamentos com ezetimiba e sinvastatina isolados. Essa característica foi largamente descrita em diferentes estudos clínicos, sendo proposta a associação de ambos os fármacos como uma boa escolha terapêutica para o tratamento da hipercolesterolemia. Porém, os chamados efeitos pleiotrópicos das estatinas dividem os clínicos entre usar uma dose maior da estatina ou introduzir a

terapia de associação. O aumento da dose de estatinas representa, em média, uma redução adicional de aproximadamente 6% de LDL colesterol a cada 10 mg de sinvastatina, enquanto o uso de 10 mg de ezetimiba co-administrada com uma estatina representa uma redução adicional de aproximadamente 15% (Bays, Neff *et al.*, 2008).

Quando estudado o efeito da sinvastatina e ezetimiba sobre as moléculas de adesão endoteliais nos pacientes hipercolesterolêmicos não foi detectada influencia desses fármacos na concentração plasmáticas das formas solúveis das moléculas de adesão, apesar de que uma redução da expressão do *ICAM1* tinha sido observada pelo tratamento combinado de sinvastatina e ezetimiba nas CMSP. Fora a redução de RNAm do *ICAM1*, esses resultados diferem de aqueles observados em nosso modelo *in vitro*, onde uma redução da expressão de RNAm e proteína de ICAM-1 e P-Selectina foram observadas. Essas diferenças podem ser atribuídas ao modelo celular utilizado, sendo possível que as CMSP não sejam um bom modelo para o estudo de moléculas adesão endoteliais.

Uma possível explicação para a expressão reduzida de RNAm do *ICAM1* nas CMSP é que a expressão de ICAM-1 é também importante na superfície dos leucócitos, especificamente em linhagens de monócito/macrófago e células T, onde tem funções de mediar interações celulares para uma melhor eficiência na resposta imunológica (Roy, Audette *et al.*, 2001).

Estudos prévios avaliaram os efeitos das estatinas em moléculas de adesão em humanos. Pacientes com DAC tratados com atorvastatina (dose média de 30 mg/dia) durante pelo menos 8 semanas mostraram valores menores de sVCAM-1 e uma tendência a valores menores de sICAM-1 no plasma dos pacientes, comparado com aqueles sem tratamento (Walter, Szabo *et al.*, 2010). A atorvastatina (40 mg/dia)

também reduziu a concentração plasmática de sICAM-1 mas não de sVCAM-1 após 8 meses de tratamento, entretanto 10 mg da atorvastatina não modificou nenhum desses marcadores em pacientes que tiveram infarto agudo de miocárdio (Hong, Choi *et al.*, 2010). Nesse último trabalho foi também relatada uma redução da IL-6 e TNF α para os tratamentos com 10 e 40 mg de atorvastatina, assim como uma redução de PCRus quando os pacientes foram tratados com 40 mg/dia desse fármaco. Cabe destacar que o tempo de tratamento maior e o fato da atorvastatina ter um efeito mais potente que a sinvastatina podem influenciar as diferenças observadas com nosso estudo, onde a monoterapia com sinvastatina não reduziu os marcadores inflamatórios.

Em nosso estudo, o uso da sinvastatina combinada com ezetimiba levou à redução de mediadores de inflamação no plasma dos pacientes hipercolesterolêmicos. Uma redução na liberação de TNF α , IL1B e MCP-1, em indivíduos hipercolesterolêmicos, foi previamente relatada para a associação de sinvastatina e ezetimiba (Krysiak e Okopien, 2011). Em pacientes que tiveram eventos coronarianos agudos, o tratamento combinado de sinvastatina e ezetimiba também mostrou reduzir IL-1 β , IL-18 e IL-6 (Undas, Machnik *et al.*, 2011). Ambos os trabalhos concluíram que a associação desses fármacos significava um maior benefício na redução do risco cardiovascular que as monoterapias.

Os resultados observados demonstram a existência de efeitos pleiotrópicos das terapias hipolipemiantes avaliadas neste estudo. Um resultado interessante é o fato de que a ezetimiba potencia o efeito anti-inflamatório da sinvastatina em pacientes hipercolesterolêmicos. Esse resultado é sugestivo de que o efeito anti-inflamatório parece decorrente da capacidade desses fármacos reduzirem o *pool* intracelular de

colesterol, mais do que pode ser atribuído à redução de síntese de seus intermediários e a conseqüente prenilação de pequenas GTPases.

É interessante notar que neste estudo a redução de marcadores inflamatórios nos pacientes hipercolesterolêmicos parece ser independente da regulação da PCRus. Isto pode ser explicado pelo perfil de indivíduos selecionados para o estudo, pois foram incluídos apenas indivíduos sem eventos cardiovasculares e não diabéticos, o que significa que esses indivíduos não necessariamente apresentam um processo de inflamação sistêmica. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito dos hipolipemiantes em indivíduos em fases iniciais da doença aterosclerótica e, de acordo com nossos resultados, a terapia hipolipemiante modula a expressão marcadores pro-inflamatórios em indivíduos hipercolesterolêmicos de forma independente da regulação da PCRus.

Outra característica interessante observada no modelo experimental *in vivo* é que não houve regulação da expressão de RNAm de *NOS3* em CMSP nem da concentração plasmática de NO nos pacientes hipercolesterolêmicos. Apesar de que esse resultado parece não estar de acordo com o aumento da expressão de *NOS3* e da liberação de NO observada para o tratamento com sinvastatina no nosso modelo experimental *in vitro* usando células HUVEC, este resultado é mais um indicador de que a modulação de marcadores inflamatórios pela terapia hipolipemiante seja independente da regulação de *NOS3*, como observado em nosso modelo *in vitro*.

O estudo da expressão gênica das moléculas de adesão monocitárias em CMSP mostrou uma redução da expressão de RNAm dos genes que codificam para PSGL-1, LFA-1 e Mac-1 após uso combinado de sinvastatina e ezetimiba.

Pelo nosso conhecimento, até o momento não há relatos do efeito de hipolipemiantes na expressão da PSGL-1 em monócitos. Um estudo anterior revelou que pacientes que apresentaram acidentes cérebros-vasculares tinham expressão elevada de PSGL-1, quando comparado com controles (Volcik, Catellier *et al.*, 2009). Desta forma, a redução de PSGL-1 observada tanto em nosso modelo de estudo de células THP-1 pelas estatinas, assim como a redução de RNAm observada em CMSP pela terapia de associação de sinvastatina e ezetimiba podem significar uma redução do risco cardiovascular causada pelo tratamento hipolipemiante.

Como mencionado anteriormente, a redução de *ITGAL* e *ITGAM* nas CMSP não foi observada no modelo de células THP-1 tratadas com os diferentes fármacos hipolipemiantes. Entretanto, a redução dessas moléculas poderia responder a uma redução da ICAM-1, seu ligando em células endoteliais. Adicionalmente, nós observamos uma redução do *ICAM1* em CMSP em resposta ao tratamento combinado de sinvastatina e ezetimiba, apesar de não ter observado diferenças na expressão de sICAM-1 no plasma desses pacientes. Uma redução da expressão de ICAM-1 na superfície de monócitos/macrófagos e linfócitos pode representar uma diminuição das interações célula-célula e levar a uma redução de seus ligantes LFA-1 e Mac-1, entretanto estudos adicionais se fazem necessários para esclarecer se há uma redução na superfície endotelial de ICAM-1 nos pacientes hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina e ezetimiba.

A redução de VLA-4 observada no modelo *in vitro* não se correlacionou com nosso modelo *in vivo*, onde não foi observada redução da expressão de RNAm do *ITGA4*. Entretanto, um estudo recente mostrou resultados similares aos nossos achados *in vivo*, onde a sinvastatina não modificou a expressão de VLA-4 na superfície de

leucócitos provenientes de pacientes diabéticos com dislipidemia mista (Stulc, Ceska *et al.*, 2012). Porém, até o momento não há relatos do efeito da associação de inibidores da síntese e absorção do colesterol na expressão dessa molécula de adesão.

7. CONCLUSÕES

O uso dos inibidores de síntese e da absorção do colesterol demonstrou modular a expressão dos marcadores de adesão celular e de inflamação em modelos experimentais de monócito e endotélio vascular, assim como também modulam a expressão desses marcadores em pacientes hipercolesterolêmicos.

No modelo experimental de endotélio vascular, as estatinas demonstraram seu efeito anti-inflamatório através da redução das moléculas de adesão ICAM-1 e P-Selectina em células HUVEC estimuladas com TNF α . Apesar de a ezetimiba diminuir a expressão gênica do *ICAM1* o seu efeito não foi observado no nível de proteína. Esses resultados, assim como aqueles observados em células THP-1, sugerem um envolvimento da terapia hipolipemiante na modulação da interação monócito-endotélio através de uma atenuação dos processos de *rolling* e adesão estável dos monócitos ao endotélio.

As estatinas podem diminuir a ativação das vias inflamação vascular, como observado na inibição da secreção das citocinas inflamatórias IL-6 e MCP-1, em células HUVEC. Apesar de que não foi possível avaliar o seu efeito em nível proteico, a sinvastatina e a ezetimiba diminuíram a expressão gênica do *IL1B*, o que é sugestivo de outra via pela qual os tratamentos hipolipemiantes podem reduzir a ativação do endotélio vascular.

As estatinas aumentaram a liberação de NO em células HUVEC, entretanto os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelas estatinas foram independentes desta via, como demonstrado em células HUVEC deficientes de *NOS3* e o uso do L-NAME.

A regulação de miRs importantes na função endotelial e progressão da doença arterial coronariana pelo diferentes tratamentos hipolipemiantes são uma nova linha de estudo que evidencia os potenciais efeitos destes fármacos na função endotelial.

No modelo *in vitro* de monócitos, o uso de atorvastatina e sinvastatina mostrou reduzir a expressão de RNAm e de proteínas na superfície celular de células THP-1 de L-Selectina, PSGL-1 e VLA-4, enquanto a redução de L-Selectina, após tratamento com ezetimiba, foi observada apenas no nível transcricional.

Os três esquemas de tratamento hipolipemiante utilizados (ezetimiba, sinvastatina e associação de ambos) foram efetivos na redução do LDL colesterol nos pacientes hipercolesterolêmicos, entretanto o tratamento com sinvastatina representa um maior benefício que o tratamento com ezetimiba, quando usadas em monoterapia. O uso da combinação de ambos os fármacos representa um benefício ainda maior na melhora do perfil lipídico desses indivíduos.

No modelo de estudo *in vivo*, a redução da expressão de RNAm de *ITGAM*, *SELPLG*, *ITGAL*, *ICAM1*, *IL1B*, *MCP1*, *TNFA* e *IL8* em CMSP, assim como a redução de citocinas inflamatórias IL1B, MCP-1, TNF α e IL-8 no plasma dos pacientes, causadas pela combinação de sinvastatina com ezetimiba (10mg cada/dia) demonstra que a esta associação contribui para a redução do risco cardiovascular. Esse resultado é sugestivo de que a regulação desses efeitos é mais dependente de uma redução maior de concentrações de colesterol total e LDL colesterol que do mecanismo de prenilação de pequenas GTPases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-SALA, L. A. et al. Effects of fluvastatin extended-release (80 mg) alone and in combination with ezetimibe (10 mg) on low-density lipoprotein cholesterol and inflammatory parameters in patients with primary hypercholesterolemia: a 12-week, multicenter, randomized, open-label, parallel-group study. **Clin Ther**, v. 30, n. 1, p. 84-97, Jan 2008. ISSN 1879-114X (Electronic)

0149-2918 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18343245>.

AOKI, C. et al. Fluvastatin upregulates endothelial nitric oxide synthase activity via enhancement of its phosphorylation and expression and via an increase in tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. **Int J Cardiol**, v. 156, n. 1, p. 55-61, Apr 5 2012. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21093076>.

APOSTOLAKIS, S. et al. Interleukin 8 and cardiovascular disease. **Cardiovasc Res**, v. 84, n. 3, p. 353-60, Dec 1 2009. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19617600>.

ARAUJO, D. B. et al. Pleiotropic effects with equivalent LDL-cholesterol reduction: comparative study between simvastatin and simvastatin/ezetimibe co-administration. **J Cardiovasc Pharmacol**, Sep 18 2009. ISSN 1533-4023 (Electronic)

0160-2446 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19770669>.

ARAZI, S. S. et al. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. **Clin Chim Acta**, v. 393, n. 2, p. 119-24, Jul 17 2008. ISSN 0009-8981 (Print)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18435918>.

BAIGENT, C. et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. **Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1267-78, Oct 8 2005. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16214597>.

BALAKUMAR, P. et al. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins? **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 1, p. 83-92, Jan 2012. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21968328 >.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print)
 0092-8674 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744438 >.

BAYS, H. E. et al. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 6, n. 4, p. 447-70, Apr 2008. ISSN 1744-8344 (Electronic)
 1477-9072 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18402536 >.

BERGMAYER, H. U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clin Chem**, v. 24, n. 1, p. 58-73, Jan 1978. ISSN 0009-9147 (Print)
 0009-9147 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22409 >.

BERNOT, D. et al. Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 41, n. 2, p. 316-24, Feb 2003. ISSN 0160-2446 (Print)
 0160-2446 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12548094 >.

BUI, Q. T.; PREMPEH, M.; WILENSKY, R. L. Atherosclerotic plaque development. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 11, p. 2109-13, Nov 2009. ISSN 1878-5875 (Electronic)
 1878-5875 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19523532 >.

CANALLI, A. A. et al. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. **Haematologica**, v. 96, n. 4, p. 526-33, Apr 2011. ISSN 1592-8721 (Electronic)
 0390-6078 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21173096 >.

CERDA, A. et al. Influence of SCARB1 polymorphisms on serum lipids of hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin. **Clin Chim Acta**, Jan 11 2010. ISSN 1873-3492 (Electronic)
 0009-8981 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20064494 >.

_____. Influence of polymorphisms and cholesterol-lowering treatment on SCARB1 mRNA expression. **J Atheroscler Thromb**, v. 18, n. 8, p. 640-51, 2011. ISSN 1880-3873 (Electronic) 1340-3478 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21512283>.

_____. Apolipoprotein E mRNA expression in mononuclear cells from normolipidemic and hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 206, 2011. ISSN 1476-511X (Electronic) 1476-511X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22074026>.

CERDA, A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. Molecular mechanisms underlying statin effects on genes involved in the reverse cholesterol transport. **Drug Metabol Drug Interact**, v. 27, n. 2, p. 101-11, 2012. ISSN 0792-5077 (Print) 0792-5077 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22706233>.

CERNUDA-MOROLLON, E.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. **Circ Res**, v. 98, n. 6, p. 757-67, Mar 31 2006. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16574916>.

CLEARFIELD, M. B. C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. **J Am Osteopath Assoc**, v. 105, n. 9, p. 409-16, Sep 2005. ISSN 0098-6151 (Print) 0098-6151 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16239491>.

COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, v. 107, n. 3, p. 255-64, Feb 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160146>.

CONSTANTIN, G. et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 759-69, Dec 2000. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163192>.

COWLED, P. A. et al. Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 141, n. 2, p. 267-76, Aug 2007. ISSN 0022-4804 (Print)

0022-4804 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17559881>.

CYBULSKY, M. I. et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 107, n. 10, p. 1255-62, May 2001. ISSN 0021-9738 (Print)
 0021-9738 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375415>.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 2, p. 189-205, Sep 2007. ISSN 0007-1188 (Print)
 0007-1188 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17592511>.

DAVIS, H. R., JR.; ALTMANN, S. W. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 7, p. 679-83, Jul 2009. ISSN 0006-3002 (Print)
 0006-3002 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19272334>.

DEL PAPA, N. et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. **J Rheumatol**, v. 35, n. 7, p. 1323-8, Jul 2008. ISSN 0315-162X (Print)
 0315-162X (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18528965>.

DIKEMAN, D. A. et al. alpha4 beta1-Integrin regulates directionally persistent cell migration in response to shear flow stimulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 1, p. C151-9, Jul 2008. ISSN 0363-6143 (Print)
 0363-6143 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18495811>.

DONG, Z. M. et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 102, n. 1, p. 145-52, Jul 1 1998. ISSN 0021-9738 (Print)
 0021-9738 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9649568>.

ECCLES, K. A. et al. Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. **Atherosclerosis**, v. 200, n. 1, p. 69-79, Sep 2008. ISSN 1879-1484 (Electronic)
 0021-9150 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18486135>.

FELDMAN, T. et al. Treatment of high-risk patients with ezetimibe plus simvastatin co-administration versus simvastatin alone to attain National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III low-density lipoprotein cholesterol goals. **Am J Cardiol**, v. 93, n. 12, p. 1481-6, Jun 15 2004. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15194017>.

FERNANDES, L. C.; MARQUES-DA-COSTA, M. M.; CURI, R. Metabolism of glucose, glutamine and pyruvate in lymphocytes from Walker 256 tumor-bearing rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 11, p. 2539-43, Nov 1994. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7549973>.

FICHTLSCHERER, S. et al. Differential effects of short-term lipid lowering with ezetimibe and statins on endothelial function in patients with CAD: clinical evidence for 'pleiotropic' functions of statin therapy. **Eur Heart J**, v. 27, n. 10, p. 1182-90, May 2006. ISSN 0195-668X (Print)

0195-668X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16621868>.

FILDES, J. E. et al. HMG-CoA reductase inhibitors deplete circulating classical and non-classical monocytes following human heart transplantation. **Transpl Immunol**, v. 19, n. 2, p. 152-7, May 2008. ISSN 0966-3274 (Print)

0966-3274 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18503891>.

FISKER HAG, A. M.; PEDERSEN, S. F.; KJAER, A. Gene expression of LOX-1, VCAM-1, and ICAM-1 in pre-atherosclerotic mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 377, n. 2, p. 689-93, Dec 12 2008. ISSN 1090-2104 (Electronic)

1090-2104 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18930708>.

FLEG, J. L. et al. Effect of statins alone versus statins plus ezetimibe on carotid atherosclerosis in type 2 diabetes: the SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study) trial. **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 25, p. 2198-205, Dec 16 2008. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19095139>.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012. ISSN 1522-9645 (Electronic)

0195-668X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21890489>.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin Chem**, v. 28, n. 10, p. 2077-80, Oct 1982. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6812986>.

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, n. 6, p. 499-502, Jun 1972. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4337382>.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597-601, Jun 10 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10376602>.

GAO, P. et al. Fluvastatin inhibits angiotensin II-induced nuclear factor kappa B activation in renal tubular epithelial cells through the p38 MAPK pathway. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 4719-25, Apr 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21947850>.

GAWAZ, M. et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 75-85, Jan 2000. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10580173>.

GAZI, I. F. et al. Effect of ezetimibe in patients who cannot tolerate statins or cannot get to the low density lipoprotein cholesterol target despite taking a statin. **Curr Med Res Opin**, v. 23, n. 9, p. 2183-92, Sep 2007. ISSN 1473-4877 (Electronic)

0300-7995 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17692154>.

GENVIGIR, F. D. et al. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 9, p. 1235-46, Sep 2010. ISSN 1744-8042 (Electronic)

1462-2416 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20860464>.

_____. Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. **Clin Chim Acta**, v. 389, n. 1-2, p. 79-86, Mar 2008. ISSN 0009-8981 (Print)
0009-8981 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18164264>.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-23, Apr 22 1999. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227295>.

GOMEZ-GARRE, D. et al. Ezetimibe reduces plaque inflammation in a rabbit model of atherosclerosis and inhibits monocyte migration in addition to its lipid-lowering effect. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 8, p. 1218-27, Apr 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19222481>.

GUZMAN, E. C. et al. Association of the apolipoprotein B gene polymorphisms with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, n. 8, p. 731-6, Aug 2000. ISSN 1434-6621 (Print)
1434-6621 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11071065>.

HAHN, C.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 1, p. 53-62, Jan 2009. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19197332>.

HAMADA, M. et al. Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. **Thromb Haemost**, v. 105, n. 2, p. 313-20, Feb 2011. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21136018>.

HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, v. 116, n. 9, p. 1081-93, Aug 28 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17671237>.

HAY, I. D. et al. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. The Committee on

Nomenclature of the American Thyroid Association. **Clin Chem**, v. 37, n. 11, p. 2002-8, Nov 1991. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1934479>.

HO, P. C. et al. Cholesterol regulation of receptor-interacting protein 140 via microRNA-33 in inflammatory cytokine production. **FASEB J**, v. 25, n. 5, p. 1758-66, May 2011. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21285396>.

HOL, J. et al. Statins affect the presentation of endothelial chemokines by targeting to multivesicular bodies. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40673, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22815786>.

HONG, S. J. et al. Low-dose versus moderate-dose atorvastatin after acute myocardial infarction: 8-month effects on coronary flow reserve and angiogenic cell mobilisation. **Heart**, v. 96, n. 10, p. 756-64, May 2010. ISSN 1468-201X (Electronic)

1355-6037 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20448126>.

HORDER, M. et al. 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, n. 7, p. 435-56, Jul 1991. ISSN 0939-4974 (Print)

0939-4974 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1932364>.

HUO, Y.; XIA, L. P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. **Trends Cardiovasc Med**, v. 19, n. 4, p. 140-5, May 2009. ISSN 1873-2615 (Electronic)

1873-2615 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19818951>.

INOUE, I. et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. **Life Sci**, v. 67, n. 8, p. 863-76, Jul 14 2000. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10946846>.

IZIDORO-TOLEDO, T. C. et al. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Mar 30 2011. ISSN 1432-1912 (Electronic)

0028-1298 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21448567>.

JANTZEN, F. et al. Isoprenoid depletion by statins antagonizes cytokine-induced down-regulation of endothelial nitric oxide expression and increases NO synthase activity in human umbilical vein endothelial cells. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 3, p. 503-14, Sep 2007. ISSN 0867-5910 (Print)

0867-5910 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17928646>.

JOHNSON, J. L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 5, n. 2, p. 265-82, Mar 2007. ISSN 1744-8344 (Electronic)

1744-8344 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17338671>.

KAGAMI, S. et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 146 Suppl 1, p. 61-6, 2008. ISSN 1423-0097 (Electronic)

1018-2438 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18504409>.

KASTELEIN, J. J. et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. **N Engl J Med**, v. 358, n. 14, p. 1431-43, Apr 3 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18376000>.

KIM, D. Y. et al. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. **Eur J Pharmacol**, v. 557, n. 1, p. 76-86, Feb 14 2007. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17169357>.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 5, p. 376-85, May 2005. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15852042>.

KIM, Y. S. et al. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 49, n. 6, p. 376-83, Jun 2007. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17577102>.

KORYBALSKA, K. et al. Atorvastatin does not impair endothelial cell wound healing in an in vitro model of vascular injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 389-95, Aug 2012. ISSN 1899-1505 (Electronic)

0867-5910 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23070088>.

KOVACS, I. B.; GOROG, D. A.; YAMAMOTO, J. Enhanced spontaneous thrombolysis: a new therapeutic challenge. **J Thromb Thrombolysis**, v. 21, n. 3, p. 221-7, Jun 2006. ISSN 0929-5305 (Print)

0929-5305 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16683213>.

KRYSIAK, R.; OKOPIEN, B. The effect of ezetimibe and simvastatin on monocyte cytokine release in patients with isolated hypercholesterolemia. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 505-12, Apr 2011. ISSN 1533-4023 (Electronic)

0160-2446 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21297492>.

KUIJK, L. M. et al. HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1beta release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3563-73, Nov 1 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18684863>.

LANDMESSER, U. et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. **Circulation**, v. 111, n. 18, p. 2356-63, May 10 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15867181>.

_____. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 110, n. 14, p. 1933-9, Oct 5 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15466656>.

LANDSBERGER, M. et al. Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 190, n. 1, p. 43-52, Jan 2007. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16529752>.

LEAF, D. A. The effect of physical exercise on reverse cholesterol transport. **Metabolism**, v. 52, n. 8, p. 950-7, Aug 2003. ISSN 0026-0495 (Print)

0026-0495 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12898457>.

LEE, C. T. et al. Lack of modulatory effect of simvastatin on indoxyl sulfate-induced activation of cultured endothelial cells. **Life Sci**, v. 90, n. 1-2, p. 47-53, Jan 2 2012. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22056374>.

LEUNG, P. O. et al. Simvastatin inhibits pro-inflammatory mediators through induction of heme oxygenase-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Toxicol Lett**, v. 207, n. 2, p. 159-66, Nov 30 2011. ISSN 1879-3169 (Electronic)

0378-4274 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21925249>.

LEWIS, G. F.; RADER, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ Res**, v. 96, n. 12, p. 1221-32, Jun 24 2005. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15976321>.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1741 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17717539>.

LI, B. et al. Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1beta level after traumatic brain injury. **Neurosurgery**, v. 65, n. 1, p. 179-85; discussion 185-6, Jul 2009. ISSN 1524-4040 (Electronic)

0148-396X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19574840>.

LI, H. et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. **Arterioscler Thromb**, v. 13, n. 2, p. 197-204, Feb 1993. ISSN 1049-8834 (Print)

1049-8834 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7678986>.

LI, H.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. **J Pathol**, v. 190, n. 3, p. 244-54, Feb 2000. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10685059>.

LI, J. et al. Atorvastatin decreases C-reactive protein-induced inflammatory response in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB pathway. **Cardiovasc Ther**, v. 28, n. 1, p. 8-14, Spring 2010. ISSN 1755-5922 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20074254>.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 89-118, 2005. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15822172>.

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 456S-460S, Feb 2006. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16470012>.

LIBBY, P.; DICARLI, M.; WEISSLEDER, R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. **J Nucl Med**, v. 51 Suppl 1, p. 33S-37S, May 1 2010. ISSN 1535-5667 (Electronic)

0161-5505 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20395349>.

LIBBY, P. et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ J**, v. 74, n. 2, p. 213-20, Feb 2010. ISSN 1347-4820 (Electronic)

1347-4820 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20065609>.

LIMA, T. M. et al. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. **Toxicol In Vitro**, v. 16, n. 6, p. 741-7, Dec 2002. ISSN 0887-2333 (Print)

0887-2333 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12423658>.

LIN, H. L. et al. Eugenosedin-A prevents high-fat diet increased adhesion molecules through inhibition of MAPK- and p65-mediated NF-kappaB pathway in rat model. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, n. 2, p. 300-9, Feb 2013. ISSN 2042-7158 (Electronic)

0022-3573 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23278698>.

LIU, P. Y. et al. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. **Circulation**, v. 119, n. 1, p. 131-8, Jan 6 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19075102>.

LIU, X. et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. **Circ Res**, v. 104, n. 4, p. 476-87, Feb 27 2009. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19150885>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

1046-2023 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846609>.

LORENOWICZ, M. J. et al. Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1542-52, Dec 2006. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16940330>.

LOTTENBERG, A. M. [Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 5, p. 595-607, Jul 2009. ISSN 1677-9487 (Electronic)

0004-2730 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19768250>.

MANGRAVITE, L. M.; THORN, C. F.; KRAUSS, R. M. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. **Pharmacogenomics J**, v. 6, n. 6, p. 360-74, Nov-Dec 2006. ISSN 1470-269X (Print)

1470-269X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16550210>.

MARTINEZ, T. L.; NASCIMENTO, H. M. [Special recommendations for lipid-lowering treatment: efficacy and safety]. **Arq Bras Cardiol**, v. 85 Supl 5, p. 6-8, Oct 2005. ISSN 0066-782X (Print) 0066-782X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16400389>.

MASSARO, M. et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. **Cardiovasc Res**, v. 86, n. 2, p. 311-20, May 1 2010. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19946014>.

MEANEY, A. et al. The VYtorin on Carotid intima-media thickness and overall arterial rigidity (VYCTOR) study. **J Clin Pharmacol**, v. 49, n. 7, p. 838-47, Jul 2009. ISSN 0091-2700 (Print) 0091-2700 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19443679>.

MILIOTI, N. et al. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2008, p. 723539, 2008. ISSN 1740-2530 (Electronic) 1740-2530 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18551190>.

MINAMI, Y. et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. **Eur J Clin Invest**, v. 39, n. 5, p. 359-67, May 2009. ISSN 1365-2362 (Electronic) 0014-2972 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19371267>.

MING, X. F. et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 24, p. 8467-77, Dec 2002. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12446767>.

MOUNT, J. N. et al. Immunoturbidimetric assays for serum apolipoproteins A1 and B using Cobas Bio centrifugal analyser. **J Clin Pathol**, v. 41, n. 4, p. 471-4, Apr 1988. ISSN 0021-9746 (Print) 0021-9746 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3366936>.

MOUTZOURI, E. et al. Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide - induced cytokine production in monocytes of

hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 381-7, Dec 2012. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23062767>.

MUNOZ-PACHECO, P. et al. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. **Pharmacol Res**, v. 66, n. 6, p. 536-43, Dec 2012. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22989505>.

NAGASSAKI, S. et al. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 7, p. 1044-9, Oct 1 2006. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16962929>.

NAKAMURA, K. et al. REMOVED: Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation. **Atherosclerosis**, Jul 15 2008. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18707687>.

NAUCK, M.; MARZ, W.; WIELAND, H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. **Clin Chem**, v. 44, n. 7, p. 1443-51, Jul 1998. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9665422>.

NI, R.; PELEG, T.; GROSS, P. L. Atorvastatin delays murine platelet activation in vivo even in the absence of endothelial NO synthase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 11, p. 2609-15, Nov 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22995523>.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-9, Jun 3 1991. ISSN 0022-1759 (Print)

0022-1759 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1710634>.

OTTERDAL, K. et al. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 928-35, Aug 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16861346>.

PAN, Z. W.; LU, Y. J.; YANG, B. F. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan 2010. ISSN 1745-7254 (Electronic) 1671-4083 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19966833>.

PANDOR, A. et al. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Intern Med**, v. 265, n. 5, p. 568-80, May 2009. ISSN 1365-2796 (Electronic) 0954-6820 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19141093>.

PAPADOPOULOU, C. et al. The role of the chemokines MCP-1, GRO-alpha, IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques. **Cytokine**, v. 43, n. 2, p. 181-6, Aug 2008. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1096-0023 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18579408>.

PAUMELLE, R. et al. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. **Circ Res**, v. 98, n. 3, p. 361-9, Feb 17 2006. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16397146>.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11328886>.

PFEIFFER, S. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 6, p. 1433-40, Jul 1996. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8832069>.

PIORKOWSKI, M. et al. Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared with higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? **J Am Coll Cardiol**, v. 49, n. 10, p. 1035-42, Mar 13 2007. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17349882 >.

POLISENO, L. et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3068-71, Nov 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16849646 >.

RAEMER, P. C.; KOHL, K.; WATZL, C. Statins inhibit NK-cell cytotoxicity by interfering with LFA-1-mediated conjugate formation. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 6, p. 1456-65, Jun 2009. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19424968 >.

RIDKER, P. M. et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. **N Engl J Med**, v. 344, n. 26, p. 1959-65, Jun 28 2001. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11430324 >.

RIPPE, C. et al. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 1, p. 45-51, Jan 2012. ISSN 1873-6815 (Electronic)

0531-5565 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22037549 >.

ROBERTS, P. J. et al. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. **J Biol Chem**, v. 283, n. 37, p. 25150-63, Sep 12 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18614539 >.

ROBINSON, J. G. et al. Pleiotropic effects of statins: benefit beyond cholesterol reduction? A meta-regression analysis. **J Am Coll Cardiol**, v. 46, n. 10, p. 1855-62, Nov 15 2005. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16286171 >.

RODRIGUES, A. C. 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**, v. 1760, n. 12, p. 1866-73, Dec 2006. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16996216>.

_____. Pharmacogenetics of OATP Transporters Reveals That SLCO1B1 c.388A>G Variant Is Determinant of Increased Atorvastatin Response. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 9, p. 5815-27, 2011. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22016628>.

ROSSI, J. et al. Laminar shear stress prevents simvastatin-induced adhesion molecule expression in cytokine activated endothelial cells. **Eur J Pharmacol**, v. 649, n. 1-3, p. 268-76, Dec 15 2010. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20863785>.

ROSSONI, L. V. et al. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. **Clin Sci (Lond)**, v. 121, n. 10, p. 449-58, Nov 2011. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21671887>.

ROY, J.; AUDETTE, M.; TREMBLAY, M. J. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in human T cells is regulated by phosphotyrosyl phosphatase activity. Involvement of NF-kappaB, Ets, and palindromic interferon-gamma-responsive element-binding sites. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 14553-61, May 4 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11278281>.

SAKODA, K. et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **J Dent Res**, v. 85, n. 6, p. 520-3, Jun 2006. ISSN 0022-0345 (Print)

0022-0345 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16723648>.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor do LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **RBAC**, v. 32, n. 3, p. 5, 2000.

SALAZAR, L. A. et al. Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. **J Clin Lab Anal**, v. 14, n. 3, p. 125-31, 2000. ISSN 0887-8013 (Print)

0887-8013 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10797611>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Agarose gel electroforesis. In: PRESS, C. S. H. C. S. H. L. (Ed.). **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York, 2001. cap. 7, p.7.9-7.12 e 7.43-7.45.

SATO, R. Sterol metabolism and SREBP activation. **Arch Biochem Biophys**, v. 501, n. 2, p. 177-81, Sep 15 2010. ISSN 1096-0384 (Electronic)

0003-9861 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20541520>.

SCHHEEL, J. S.; MARKS, R. E.; BOSS, G. R. Signaling by small GTPases in the immune system. **Immunol Rev**, v. 218, p. 92-101, Aug 2007. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17624946>.

SERRANO, C. V., JR. et al. Native LDL-cholesterol mediated monocyte adhesion molecule overexpression is blocked by simvastatin. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 23, n. 3, p. 215-20, Jun 2009. ISSN 1573-7241 (Electronic)

0920-3206 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19125317>.

SETTERGREN, M. et al. Cholesterol lowering is more important than pleiotropic effects of statins for endothelial function in patients with dysglycaemia and coronary artery disease. **Eur Heart J**, v. 29, n. 14, p. 1753-60, Jul 2008. ISSN 1522-9645 (Electronic)

1522-9645 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18441323>.

SETTERGREN, M.; RYDEN, L.; PERNOW, J. Letter by Settergren et al regarding article, "Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation". **Circulation**, v. 120, n. 9, p. e68; author reply e69-70, Sep 1 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19720944>.

SHEN, Y. et al. Simvastatin attenuates cardiopulmonary bypass-induced myocardial inflammatory injury in rats by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Eur J Pharmacol**, v. 649, n. 1-3, p. 255-62, Dec 15 2010. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20858481>.

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, Jun 1983. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6851096>.

SORKIN, S. C. et al. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem Lab Med**, v. 43, n. 12, p. 1339-45, 2005. ISSN 1434-6621 (Print)

1434-6621 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16309370>.

SOUZA-COSTA, D. C. et al. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. **Atherosclerosis**, v. 193, n. 2, p. 438-44, Aug 2007. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16938300>.

SPOSITO, A. C. et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. **Arq Bras Cardiol**, v. 88 Suppl 1, p. 2-19, Apr 2007. ISSN 1678-4170 (Electronic)

1678-4170 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17515982>.

STACH, K. et al. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. **Cardiol J**, v. 19, n. 1, p. 20-8, 2012. ISSN 1897-5593 (Electronic)

1898-018X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22298164>.

STALKER, T. J.; LEFER, A. M.; SCALIA, R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 3, p. 406-12, Jun 2001. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375257>.

STAVROULOPOULOS, A. et al. Monocyte expression of adhesion molecules during low- and high-flux polysulfone hemodialysis and the effect of atorvastatin administration. **Blood Purif**, v. 29, n. 3, p. 274-9, 2010. ISSN 1421-9735 (Electronic)

0253-5068 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20068293>.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F., JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, Oct 2004. ISSN 0031-9333 (Print)
 0031-9333 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15383655>.

STULC, T. et al. The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 diabetes mellitus. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 33 Suppl 2, p. 73-7, 2012. ISSN 0172-780X (Print)
 0172-780X (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23183514>.

SUH, J. W. et al. HMG-CoA reductase inhibitor improves endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats via down-regulation of caveolin-1 and activation of endothelial nitric oxide synthase. **J Korean Med Sci**, v. 25, n. 1, p. 16-23, Jan 2010. ISSN 1598-6357 (Electronic)
 1011-8934 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20052342>.

TAYLOR, A. J. et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. **N Engl J Med**, v. 361, n. 22, p. 2113-22, Nov 26 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
 0028-4793 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19915217>.

TERSHAKOVEC, A. M.; VELTRI, E. P.; PASTERNAK, R. C. Letter by Tershakovec et al regarding article, "Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation". **Circulation**, v. 120, n. 9, p. e67; author reply e69-70, Sep 1 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)
 0009-7322 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19720943>.

TIAN, D. et al. Overexpression of steroidogenic acute regulatory protein in rat aortic endothelial cells attenuates palmitic acid-induced inflammation and reduction in nitric oxide bioavailability. **Cardiovasc Diabetol**, v. 11, p. 144, 2012. ISSN 1475-2840 (Electronic)
 1475-2840 (Linking). Disponible em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23170972>.

TOUSOULIS, D. et al. Statins in heart failure. Beyond the lipid lowering effect. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 2, p. 144-50, Feb 7 2007. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17175040>.

UNDAS, A. et al. Ezetimibe combined with simvastatin compared with simvastatin alone results in a greater suppression of oxidative stress and enhanced fibrinolysis in patients after acute coronary events. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 58, n. 2, p. 167-72, Aug 2011. ISSN 1533-4023 (Electronic)

0160-2446 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21558878>.

VAN DER MEIJ, E. et al. A clinical evaluation of statin pleiotropy: statins selectively and dose-dependently reduce vascular inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53882, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23349755>.

VAN GILS, J. M.; ZWAGINGA, J. J.; HORDIJK, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 2, p. 195-204, Feb 2009. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18948548>.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. ISSN 1465-6914 (Electronic)

1465-6906 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12184808>.

VOLCIK, K. A. et al. SELP and SELPLG genetic variation is associated with cell surface measures of SELP and SELPLG: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. **Clin Chem**, v. 55, n. 6, p. 1076-82, Jun 2009. ISSN 1530-8561 (Electronic)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19395438>.

VON HAEHLING, S. Statins for heart failure: still caught in no man's land? **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 1, p. 37-9, Jan 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18973470>.

WAGNER, B. J. et al. Simvastatin reduces tumor cell adhesion to human peritoneal mesothelial cells by decreased expression of VCAM-1 and beta1 integrin. **Int J Oncol**, v. 39, n. 6, p. 1593-600, Dec 2011. ISSN 1791-2423 (Electronic)

1019-6439 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21874229>.

WALTER, T. et al. Effect of atorvastatin on cellular adhesion molecules on leukocytes in patients with normocholesterolemic coronary artery disease. **In Vivo**, v. 24, n. 2, p. 189-93, Mar-Apr 2010. ISSN 0258-851X (Print)

0258-851X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20363993>.

_____. Effect of atorvastatin on haemostasis, fibrinolysis and inflammation in normocholesterolaemic patients with coronary artery disease: a post hoc analysis of data from a prospective, randomized, double-blind study. **Clin Drug Investig**, v. 30, n. 7, p. 453-60, 2010. ISSN 1173-2563 (Print)

1173-2563 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20441243>.

WANG, C. Y.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 1, p. 37-44, Jan 2008. ISSN 1471-4914 (Print)

1471-4914 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18068482>.

WESTERINK, J.; VISSEREN, F. L. Letter by Westerink and Visseren regarding article, "Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation". **Circulation**, v. 120, n. 9, p. e66; author reply e69-70, Sep 1 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19720942>.

WILLRICH, M. A. et al. CYP3A53A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. **Clin Chim Acta**, v. 398, n. 1-2, p. 15-20, Dec 2008. ISSN 0009-8981 (Print)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18727922>.

WITHERSPOON, L. R. et al. Chemically blocked analog assays for free thyronines. I. The effect of chemical blockers on T4 analog and T4 binding by albumin and by thyroxin-binding globulin. **Clin Chem**, v. 34, n. 1, p. 9-16, Jan 1988. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3123097>.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 21-22, p. 1570-9, Nov 11 2010. ISSN 1873-3492 (Electronic)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20633546>.

YAKUBU, M. A.; NSAIF, R. H.; OYEKAN, A. O. peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation-mediated regulation of endothelin-1 production via nitric oxide and protein kinase C signaling pathways in piglet cerebral microvascular endothelial cell culture. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 2, p. 774-81, Feb 2007. ISSN 0022-3565 (Print)
 0022-3565 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17105827>.

YAMASHITA, S. et al. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. **J Atheroscler Thromb**, v. 17, n. 5, p. 436-51, May 2010. ISSN 1880-3873 (Electronic)
 1340-3478 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20513953>.

YANG, J. C. et al. Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. **Inflamm Res**, v. 61, n. 5, p. 485-91, May 2012. ISSN 1420-908X (Electronic)
 1023-3830 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22245985>.

YE, Y. et al. The role of eNOS, iNOS, and NF-kappaB in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 1, p. H343-51, Jul 2008. ISSN 0363-6135 (Print)
 0363-6135 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18469150>.

ZAITONE, S. A.; ABO-GRESHA, N. M. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF. **Eur J Pharmacol**, v. 691, n. 1-3, p. 134-42, Sep 15 2012. ISSN 1879-0712 (Electronic)
 0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22732653>.

ZHANG, C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 114, n. 12, p. 699-706, Jun 2008. ISSN 1470-8736 (Electronic)
 0143-5221 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18474027>.

ZHANG, Y. et al. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 11, p. 1764-71, Nov 2009. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19729613>.

ZHAO, J. et al. Effects of atorvastatin on fine particle-induced inflammatory response, oxidative stress and endothelial function in human umbilical vein endothelial cells. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 11, p. 1828-39, Nov 2011. ISSN 1477-0903 (Electronic)
 0960-3271 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21357632>.

ZHAO, X.; BENVENISTE, E. N. Transcriptional activation of human matrix metalloproteinase-9 gene expression by multiple co-activators. **J Mol Biol**, v. 383, n. 5, p. 945-56, Nov 28 2008. ISSN 1089-8638 (Electronic)
 1089-8638 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18790699>.

ZHENG, C. et al. Statins suppress apolipoprotein CIII-induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion. **Eur Heart J**, v. 34, n. 8, p. 615-24, Feb 2013. ISSN 1522-9645 (Electronic)
 0195-668X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22927557>.

ZINEH, I. et al. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 3, p. 333-40, Mar 2006. ISSN 0277-0008 (Print)
 0277-0008 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16503719>.

ZSCHIEDRICH, I. et al. Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 264-76, Jul 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic)
 0006-4971 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18469200>.

Páginas WEB

www.world-heart-federation.org. Acessada em 01/04/2013.

www.datasus.gov.br. Acessada em 01/04/2013.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em pesquisa da FCF/USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/38/2010
Protocolo CEP/FCF/540
CAAE: 0086.0.198.018-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular 'in vivo' e 'in vitro'
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	Biossegurança
Patrocinadores:	-

II - Sumário Geral do Protocolo:

A aterosclerose é uma das principais causas de doença cardiovascular a qual tem alta prevalência no mundo. É uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomicrons), hipertensão arterial, obesidade, hiperglicemia ou tabagismo. As estatinas (ou inibidores da HMG-CoA redutase) são usadas para prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana. O tratamento com estatinas diminui os níveis de lipídeos séricos e o risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Outras propriedades têm sido propostas incluindo melhora da disfunção endotelial, liberação de células progenitoras do endotélio, propriedades antiinflamatórias e atividade antitumoral. A resposta clínica às estatinas tem-se demonstrado altamente variável. Embora as doses sejam ajustadas individualmente, grande parte dos pacientes não consegue as metas de redução esperadas. Variação genética pode estar relacionada com a resposta terapêutica às estatinas. Desde sua descoberta, estatinas naturais e quimicamente modificadas têm-se disponibilizado comercialmente, incluindo pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina e rosuvastatina. Considerando a importância dos efeitos pleiotrópicos (diminuição da produção de substâncias intermediárias da síntese do colesterol) das estatinas na prevenção da aterosclerose, é relevante elucidar os mecanismos moleculares pelos quais as estatinas podem regular o processo inflamatório e as suas implicações na função endotelial modulando a expressão de eNOS (marcador pro-inflamatório endotelial) e de moléculas de adesão em células de linhagem endotelial; assim como também avaliar o perfil de expressão destes marcadores em pacientes hipercolesterolêmicos tratados com estatinas

Os objetivos do presente estudo são:

Avaliar os efeitos da sinvastatina e da ezetimiba (um hipolipemiante não estatina) na expressão de RNAm de marcadores pro-inflamatórios (TNF α , NFkB e IL-6), endotelial (eNOS), e de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e P-selectin) em células de linhagem endotelial HUVEC (derivadas da veia do cordão umbilical humano) e

Página 1

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos hipercolesterolêmicos (HC).

Tipo de estudo: Prospectivo

Descrição da Casuística:

Serão selecionados 100 indivíduos, de ambos os gêneros, com idades entre 40 e 70 anos. Desses indivíduos, 50 serão hipercolesterolêmicos (HC) e 50 normolipidêmicos (NL). Os indivíduos serão selecionados na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP).

Os critérios de inclusão dos participantes são:

LDL colesterol >160 mg/dL e TG <350 mg/dL para o grupo HC, e LDL colesterol <130 mg/dL e TG <150 mg/dL para o grupo NL. Serão incluídos indivíduos fumantes e não fumantes, com e sem hipertensão, mulheres em pré e pós-menopausa, todos eles sem eventos de DAC.

Serão critérios de exclusão:

Serão excluídos do estudo indivíduos com doenças da tireóide, diabetes melito, doença hepática e renal grave, mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos, e pacientes em uso de antiinflamatórios.

III – Situação do Projeto: APROVADO em 29/03/2010.

Atendendo a Resolução CNS 346/2005, este Comitê não enviará o presente protocolo à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, uma vez que o mesmo já foi enviado pelo CEP do Hospital Universitário. No entanto, o pesquisador responsável deverá aguardar aprovação da CONEP para iniciar a pesquisa.

Cabe, ainda ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Entregar a carta de aprovação da CONEP;
- Apresentar relatório parcial em dez/2011 e relatório final em dez/2013.

São Paulo, 30 de março de 2010.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Página 2

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário da USP.

São Paulo, 15 de janeiro de 2010.

Ilmo(a), Sr(a),

Profa. Dra. Rosário Domínguez Crespo Hirata

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Referente: **Projeto de Pesquisa:** "Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular *in vitro* e *in vivo*" – **Pesquisador responsável:** Profa. Dra. Rosário Domínguez Crespo Hirata – **Co-investigador(es):** Álvaro Danilo Cerda Maureira, Fabiana Dalla Vecchia Gengivir, Mario Hiroyuki Hirata, Gelba Almeida Pinto, Maria Cecília Gusukuma, Egidio Lima Dórea, Silvy Stuchi Maria-Engler – **Registro CEP-HU/USP:** 971/09 – **SISNEP CAAE:** 0086.1.198.018-09 – **Área temática especial:** Grupo I – Biossegurança.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião realizada no dia 15 de janeiro de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, sendo o Projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, considerando **APROVADO E ENCAMINHADO para apreciação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS), devendo o Estudo ser iniciado somente após a aprovação da referida Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios semestrais (e relatório final ao término do trabalho), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

ANEXO 3: Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

São Paulo, 02 de abril de 2011.

$I_l^{mo(a)}, S^{r(a)}$.

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular in vitro e in vivo*” – **Pesquisador(a) responsável:** Prof. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata - **Co-autor(es):** Álvaro Danilo Cerda Maureira, Fabiana Dalla Vecchia Gengivir, Mario Hiroyuki Hirata, Gelba Almeida Pinto, Maria Cecília Gusukuma, Egidio Lima Dorea, Silvy Maria Engler – **Registro CEP-HU/USP:** 971/09 - **SISNEP CAAE:** 0086.0.198.018-09 – **Registro CONEP:** 15894 – **Área Temática Especial:** Biossegurança.

Prezada Professora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CEP-HU/USP), em reunião ordinária realizada no dia 01 de abril de 2011, apresentou aos Senhores Membros a resposta enviada por V. Sa., às recomendações feitas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, através do Parecer Nº 125/2011, de 08 de fevereiro de 2011.

O CEP-HU/USP considerou como atendidas as recomendações, sendo APROVADO o início do estudo, lembrando que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios semestrais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra “c”. **O primeiro relatório está previsto para 01 de outubro de 2011.**

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tels.: (11) 3091-9457 ou 9479 – Fax: (11) 3091-9452 – E-mail: cep@hu.usp.br

ANEXO 4: Parecer da Comissão Interna de Biossegurança da FCF/USP.

Of.ATAD/0112010/FCF	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão Interna de Biossegurança
--	--	---

São Paulo, 26 de fevereiro de 2010

Prezada Senhora,

Informo a V.Sa. que o Projeto "Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular *in vivo* e *in vitro*" foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas em reunião de 25 de fevereiro do corrente ano.

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MÁRIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. ROSARIO DOMÍNGUEZ CRESPO HIRATA
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP
NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadcf.usp.br

ANEXO 5: Certificado de Qualidade em Biossegurança da FCF/USP.

Seção 3 **Diário Oficial** nº 244-E, segunda-feira, 21 de dezembro de 1998
ISSN 1415-1553

II - Processo n.º 01200.003570/98-08.
Interessado: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP.
CGC: 63.025.530/0015-00.
Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", CEP: 05508-900, São Paulo - SP. Telefone: (011) 818-3678; Fax: (011) 211-8986.
Assunto: Solicitação de Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB.

Decisão: Deferido, ficando atestada a idoneidade técnico-científica da Instituição requerente, assim como suas instalações, para as atividades de pesquisa em regime de contenção, ensino, transporte, armazenamento e descarte com microrganismos geneticamente modificados, definidos pela requerente de acordo com o Anexo I, da Lei n.º 8.974, de 05 de janeiro de 1995, como organismos do Grupo I. A CTNBio esclarece que, para as atividades de pesquisa em regime de contenção com microrganismos geneticamente modificados, a requerente deverá observar as normas estabelecidas pela Instrução Normativa n.º 7, da

CTNBio, publicada no Diário Oficial da União de 09.06.97, Seção 1, páginas 11.827 a 11.833. A CTNBio esclarece, ainda, que a realização de atividades com OGM do Grupo II ficará na dependência de visita prévia, efetuada pela CTNBio, às instalações onde o trabalho deverá ser executado.
CQB n.º 0090/98.

ANEXO 6. Termo de consentimento livre e esclarecido

Hospital Universitário e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
 Pesquisa: Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular *in vivo* e *in vitro*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **“Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular *in vivo* e *in vitro*”**

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

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

Prezado Paciente,

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

Nesta pesquisa, vou medir gorduras (lipídeos), realizar testes de laboratório que avaliam o processo inflamatório no sangue e, fazer testes de laboratório especiais (RNA e proteínas) para verificar como medicamentos que diminuem o colesterol contribuem para diminuir o processo inflamatório.

Se aceitar participar desta pesquisa, será coletada uma amostra de sangue (10 mL) em jejum para os exames de laboratório de lipídeos (triglicerídeos e colesterol e suas frações), apolipoproteínas AI e B (proteínas relacionadas com os lipídeos), proteínas relacionadas com inflamação (IL-6, PCRus, sVCAM, sICAM, TNF α e outros marcadores inflamatórios) e enzimas (para avaliar alterações do fígado e do músculo). Será coletada também uma amostra de sangue (10 mL) para medir o RNA e as proteínas nas células do sangue, que serão guardadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico (LBMA) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e poderão ser utilizadas para pesquisas futuras relacionadas com colesterol alto e inflamação. Se isso ocorrer, você será informado e convidado a participar de outros projetos de pesquisa relacionados. **As coletas serão realizadas utilizando-se material estéril e descartável, no setor de coleta do Hospital Universitário a cargo de um dos colaboradores do projeto.**

Se o seu colesterol estiver normal você vai participar da pesquisa uma única vez. Se o colesterol estiver alto (colesterol total maior que 200 mg/dL e LDL colesterol maior que 160 mg/dL) e, caso esteja tomando medicamento para diminuir o colesterol e o seu médico achar apropriado e seguro, você terá de parar o tratamento durante um mês, enquanto isso, você terá que fazer uma dieta especial (pouco colesterol e gordura saturada). Depois disso, se for necessário, você terá que tomar medicamentos para diminuir o colesterol. O seu médico vai receitar primeiro o ezetimibe (10 mg/dia) por um mês e, depois, a sinvastatina (10 mg/dia) por dois meses e sinvastatina (20 mg/dia) por um mês. Se o seu colesterol continuar alto, o médico vai receitar o ezetimibe junto com a sinvastatina por mais um mês. Portanto, você vai participar do estudo durante seis meses e as coletas de sangue vão ser feitas antes da dieta, após um mês de dieta, após um mês de tratamento com ezetimibe (10 mg/dia), após dois meses de tratamento com sinvastatina (10 mg/dia), após um mês de tratamento com sinvastatina (20 mg/dia) e depois de um mês de tratamento com os dois medicamentos juntos. Em cada visita ao hospital, serão coletadas duas amostras de sangue em jejum, uma (10 mL) para os exames laboratoriais e a outra (10 mL) para medir RNA e proteínas

Hospital Universitário e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
 Pesquisa: Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e de adesão celular *in vivo* e *in vitro*

nas células. **O monitoramento do tratamento farmacológico estará a cargo do Dr. Egidio Lima Dorea (CRM: 65920).**

Além de você, outros noventa e nove pacientes também participarão da pesquisa. Precisaréi, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças de familiares e os medicamentos que está tomando.

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

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

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

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

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

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

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

Você permite o armazenamento do seu RNA e soro no banco de material biológico?

Sim () Não ()

São Paulo, _____ de _____ de 201__.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

ANEXO 7. Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5842624/2 - Álvaro Danilo Cerda Maureira

Email:	alvarocerda@usp.br
Data de Nascimento:	20/06/1983
Cédula de Identidade:	RNE - V504290-W - DF
Local de Nascimento:	Chile
Nacionalidade:	Chilena
Graduação:	Licenciado em Tecnologia Médica - Universidad de La Frontera - Chile - 2005
Mestrado:	Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	27/05/2009
Início da Contagem de Prazo:	27/05/2009
Data Limite:	27/05/2013
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Rosario Dominguez Crespo Hirata - 27/05/2009 até o presente. E.Mail: rosariohirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 27/05/2009 Português, Aprovado em 27/05/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/06/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 27/05/2009 Mudança de Norma em 28/08/2009 Mudança de Regulamento em 28/08/2009 Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5842624/2 - Álvaro Danilo Cerda Maureira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MAE5755-6/1	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	17/08/2009	04/12/2009	120	8	96	A	N	Concluída
FBC5708-4/1	Farmacogenômica Cardiovascular	05/05/2010	15/06/2010	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5709-4/3	Biologia Molecular em Análises Clínicas	20/09/2010	24/10/2010	75	5	80	A	N	Concluída
FBC5722-2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	100	A	N	Concluída
BMB5818-1/2	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/08/2011	01/09/2011	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	4	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	27
Estágios:			
Total:	0	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2013

Impresso em: 08/04/13 08:08:17

ANEXO 8. Curriculum lattes

 Imprimir
currículo
Alvaro Danilo Cerda Maureira Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0268793562726403>

Última atualização do currículo em 07/04/2013

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Tecnologia Médica menção Laboratório Clínico, Hematologia e Banco de Sangue e o grau de Licenciado em Tecnologia Médica - Universidad de la Frontera, Chile (2005). Possui experiência na área de Análises Clínicas e mestrado em Farmácia área Análises Clínicas pela Universidade de São Paulo. Atualmente é aluno de doutorado em Farmácia (Análises Clínicas) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Alvaro Danilo Cerda Maureira
Filiação Maurício Eleodoro Cerda Bustos e Brunilda del Carmen Maureira Sanzana
Nascimento 20/06/1983 - Temuco/ - Chile
Carteira de Identidade 152437102 Chile -- 04/04/2007
CPF 232.874.878-33
Passaporte 152437102

Formação acadêmica/titulação

- 2009** Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Papel das estatinas na modulação de biomarcadores de inflamação e adesão celular in vivo e in vitro.
 Orientador: Rosario Dominguez Crespo Hirata
 Bolsista do(a): Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- 2007 - 2009** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Receptor Scavenger B I: Estudo de polimorfismos e expressão gênica em pacientes hipercolesterolêmicos. Ano de obtenção: 2009
 Orientador: Rosario Dominguez Crespo Hirata
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2001 - 2005** Graduação em Licenciatura em Tecnologia Médica.
 Universidad de La Frontera, U.FRONTERA, Temuco, Chile
 Título: Mutacion Gly972Arg en mujeres con ovario poliquístico y controles de la IX region de La Araucania
 Orientador: Luis Antonio Salazar Navarrete
- 2001 - 2005** Graduação em Tecnologia Médica menção Laboratorio Clínico, hem.
 Universidad de La Frontera, U.FRONTERA, Temuco, Chile

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Componente genético de enfermedades complejas.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Treinamento prático de instalação e uso de QIAcube.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Aplicações da citometria de Fluxo em modelos exper.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em treinamento de PCR em tempo real.
 Life Technologies, LIFE TEC, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Manejo de conflicto y trabajo en equipo.
 Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Farmacogenética Cardiovascular.
 Universidad de La Frontera, U.FRONTERA, Temuco, Chile
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Prevención de Riesgos en la Exposición de Agentes.
 Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Reforma de Salud e Internalización del Nuevo Model.
 Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Garantías Explícitas de Salud G.E.S..
 Servicio de Salud araucania Sur, SSAS, Chile

- 2006 - 2006** Curso de curta duração em English Language Course, English World Language Center, EW, Chile
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Sistemas de Gestión de la Calidad Aplicados al Lab. Universidad de La Frontera, U.FRONTERA, Temuco, Chile

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: livre, Enquadramento funcional: monitoria, Carga horária: 6, Regime: Parcial

Atividades

02/2008 - 07/2008 Graduação, Farmácia-Bioquímica

Disciplinas ministradas:
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). FBC0512-Bioquímica Clínica

2. Hospital Nreva Imperial - HNI

Vínculo institucional

- 2006 - 2008** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Tecnólogo Médico, Laboratório Clínico, Carga horária: 44, Regime: Integral
- 2005 - 2005** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Auxiliar Paramédico, Laboratório Clínico, Carga horária: 44, Regime: Integral
- 2004 - 2004** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Auxiliar paramédico, Laboratório Clínico, Carga horária: 44, Regime: Integral
- 2004 - 2004** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Auxiliar Paramédico, Laboratório Clínico, Carga horária: 44, Regime: Integral

Atividades

01/2007 - 06/2007 Conselhos, Comissões e Consultoria, Programa de Saúde Intercultural PROMAP

Especificação:
Assistência e colaboração na integração da Saúde Intercultural

3. Universidad de La Frontera - U.FRONTERA

Vínculo institucional

- 2004 - 2004** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno Ajudante - Banco de Sangue, Carga horária: 2, Regime: Parcial
- 2003 - 2004** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno ajudante - Bioquímica Geral, Carga horária: 2, Regime: Parcial

Atividades

10/2004 - 12/2004 Extensão Universitária, Dirección General de Extension y Comunicaciones

Especificação:
Projeto de Extensão e Comunicações de Acreditação Permanente Nº 041/2004: "Promoción de Salud en Escuela Básica. Satisfacción de una Necesidad y Aporte al Entorno Social"

4. Servicio de Salud araucanía Sur - SSAS

Vínculo institucional

2003 - 2003 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Campanha "Da Vida...Dona Sangre", Carga horária: 2, Regime: Parcial

Revisor de periódico

1. Pharmacogenomics Journal (Print)

Vínculo

2012 - Atual Regime: Parcial

2. Lipids in Health and Disease

Vínculo**2012 - Atual** Regime: Parcial

3. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Cessou em 2008. Cont. I

Vínculo**2011 - Atual** Regime: Parcial

4. AFR J PHARM PHARMACO

Vínculo**2011 - Atual** Regime: Parcial

5. Clinica Chimica Acta (Print)

Vínculo**2010 - Atual** Regime: Parcial**Áreas de atuação**

1. ANÁLISES CLÍNICAS
2. Biologia Molecular Aplicada
3. Farmacogenética

Projetos**Projetos de pesquisa****2012 - Atual** Papel de estatinas na modulação de microRNAs em células mononucleares de pacientes hipercolesterolêmicos

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);
 Integrantes: Alvaro Danilo Cerda Maureira Luis Salazar Navarrete; Egidio L. Dorea; Rosario D.C. Hirata (Responsável); Cristina Moreno Fajardo; Pinto, GA.; Hirata, Mario H; Elizandra Silva Guimarães; Tomas Zambrano; Gauber Costa-Brito
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2011 - Atual Papel das estatinas na modulação de marcadores de inflamação e adesão celular in vitro e in vivo

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Doutorado (2);
 Integrantes: Alvaro Danilo Cerda Maureira Fabiana Genvigir; Mario Hirata; Egidio L. Dorea; Rosario D.C. Hirata (Responsável); Rodrigues, AC.; Curi, R.; Pinto, GA.; Gusukuma, MC.
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2010 - Atual Influência de inibidores de síntese e absorção de colesterol na expressão de proteínas do transporte reverso do colesterol em células HepG2 e Caco-2

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Doutorado (2);
 Integrantes: Alvaro Danilo Cerda Maureira Mario Hirata; Rosario D.C. Hirata (Responsável); Rodrigues, AC.; Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia; Cristina Moreno Fajardo
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2007 - 2010 Influência do tratamento com estatinas e/ou ezetimiba sobre a expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Doutorado (4);
 Integrantes: Alvaro Danilo Cerda Maureira Simone Sorkin Araz; Mario Hirata; Marcia Bernik; Egidio L. Dorea; Rosario D.C. Hirata (Responsável); Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia; Willrich, Maria Alice Vieira

2004 - 2006 Frequência do polimorfismo Gly972Arg do sustrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) em mulheres mapuche portadoras de síndrome de ovário policístico e controles

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Graduação (4);
 Integrantes: Alvaro Danilo Cerda Maureira Cristobal Barrenechea Cofre; Luis Salazar Navarrete (Responsável); Patricio Valdes; Marlene Kehr; Carolina Soto
 Financiador(es): DIDUFRO-DIDUFRO

Idiomas

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

Prêmios e títulos

- 2012** Menção Honrosa. Student Oral presentation no AACC Anual Meeting 2012, American Association for Clinical Chemistry
- 2012** Student Travel Grant Award no AACC Anual Meeting 2012, American Association for Clinical Chemistry
- 2008** prêmio DOLES ao melhor trabalho na área de bioquímica Clínica no 20º IFCC-WorldLab, 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
- 2005** Prêmio Universidad de La Frontera. Melhor Aluno Promoção Ano 2005, Universidad de La Frontera
- 2004** Menção Honrosa. Trabalho científico apresentado no XII Congresso Chileno de Tecnología Médica, Colegio de Tecnólogos Médicos de Chile A.G.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) FORESTIERO, FRANCISCO JOSE, CECON, LETICIA, HIRATA, MARIO HIROUKI, DE MELO, FERNANDO FIUZA, CARDOSO, ROSILENE FRESSATTI, **Cerda, Alvaro**, Hirata, Rosario Dominguez Crespo Relationship of NAT2, CYP2E1 and GSTM1/GSTT1 polymorphisms with mild elevation of liver enzymes in Brazilian individuals under anti-tuberculosis drug therapy. *Clinica Chimica Acta* (Print). [JCB](#), v.415, p.215 - 219, 2013.
2. [doi](#) Issa, Mustafa H., **Cerda, Alvaro**, Genvigir, Fabiana D.V., Cavalli, Selma A., Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, Mario H., Hirata, Rosario D.C. Atorvastatin and hormone therapy effects on APOE mRNA expression in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. [JCB](#), v.128, p.139 - 144, 2012.
3. [doi](#) Silbiger, VN, Hirata, MH, Luchessi, AD, Genvigir, FDV., **CERDA, A.**, Rodrigues, AC, Willrich, MA, Arazi, SS., Dorea, EL., Bernik, MMS, Faludi, Andre A., Bertolami, Marcelo C, Santos, C., Carracedo, A, Salas, A., Freire, A., Lareu, MV., Phillips, C., Porras-Hurtado, L., Fondevila, M., Hirata, RDC. Differentiation of African Components of Ancestry to Stratify Groups in a Case-Control Study of a Brazilian Urban Population. *Genetic Testing (Cessou em 2008. Cont. ISSN 1945-0265 Genetic Testing and Molecular Biomarkers)*. [JCB](#), v.16, p.524 - 530, 2012.
4. [doi](#) Luchessi, André@ Ducati, Silbiger, Vivian Nogueira, **Cerda, Alvaro**, Hirata, Rosario Dominguez Crespo, Carracedo, Angel, Brion, Maria, Jáizquez, Andres, Bravo, Marisol, Bastos, Guillermo, Sousa, Amanda Guerra Moraes Rego, Hirata, Mario Hiroyuki Increased clopidogrel response is associated with ABCC3 expression: A pilot study. *Clinica Chimica Acta* (Print). [JCB](#), v.413, p.417 - 421, 2012.
5. [doi](#) REBELO, ANA CRISTINA, VERLENGIA, ROZANGELA, KUNZ, VANDENI, TAMBURUS, NAYARA, **Cerda, Alvaro**, HIRATA, ROSARIO, HIRATA, MARIO, SILVA, ESTER Lack of Association of Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms with Cardiorespiratory and Metabolic Variables in Young Women. *International Journal of Molecular Sciences* (Online). [JCB](#), v.13, p.13691 - 13703, 2012.
6. [doi](#) **CERDA, A.**, Hirata, MH, Hirata, RDC. Molecular mechanisms underlying statin effects on genes involved in the reverse cholesterol transport. *Drug Metabolism and Drug Interactions.*, v.27, p.101 - 111, 2012.
7. [doi](#) Guerra-Shinohara, E. M., Bertinato, J. F., Tosin Bueno, C., Cordeiro da Silva, K., Burlacchini de Carvalho, M. H., Pulcinelli Vieira Francisco, R., Zugaib, M., **CERDA, A.**, Morelli, V. M. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Thrombosis and Haemostasis*. [JCB](#), v.108, p.693 - 700, 2012.
8. [doi](#) Genvigir, FDV., Rodrigues, AC, **CERDA, A.**, Hirata, MH, Curi, R., Hirata, RDC. ABCA1 and ABCG1 expressions are regulated by statins and ezetimibe in Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Drug Interactions.*, v.26, p.33 - 36, 2011.
9. [doi](#) **Cerda, Alvaro**, Genvigir, Fabiana DV, Willrich, Maria AV, Arazi, Simone S, Bernik, Marcia MS, Dorea, Egidio L, Bertolami, Marcelo C, Faludi, Andre A, Hirata, Mario H, Hirata, Rosario DC Apolipoprotein E mRNA expression in mononuclear cells from normolipidemic and hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin. *Lipids in health and disease*. [JCB](#), v.10, p.206 - , 2011.
10. [doi](#) **Cerda, Alvaro**, Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia, Rodrigues, Alice Cristina, Willrich, Maria Alice Vieira, Dorea, Egidio Lima, Bernik, Márcia Martins Silveira, Arazi, Simone Sorkin, Oliveira, Raquel de, Hirata, Mario Hiroyuki, Hirata, Rosario Dominguez Crespo Influence of Polymorphisms and Cholesterol-Lowering Treatment on SCARB1 mRNA Expression. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.*, v.18, p.640 - 651, 2011.
11. [doi](#) Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia, Rodrigues, Alice Cristina, **Cerda, Alvaro**, Arazi, Simone Sorkin, Willrich, Maria Alice Vieira, Oliveira, Raquel, Hirata, Mario Hiroyuki, Dorea, Egidio Lima, Bernik, Márcia Martins, Curi, Rui, Hirata, Rosario Dominguez Crespo Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. *Pharmacogenomics* (London). [JCB](#), v.11, p.1235 - 1246, 2010.
12. [doi](#) **CERDA, A.**, Genvigir, Fabiana D.V., Arazi, Simone S., Hirata, Mario H., Dorea, Egidio L., Bernik, Marcia M.S., Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, Rosario D.C. Influence of SCARB1 polymorphisms on serum lipids of hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin. *Clinica Chimica Acta* (Print). [JCB](#), v.411, p.631 - 637, 2010.
13. **CERDA, A.**, Arazi, SS., Genvigir, FDV., Hirata, MH, Dorea, EL., Bernik, MMS, Hirata, RDC. Polimorfismos no receptor Scavenger classe B tipo I e sua relação com perfil lipídico sérico e resposta a atorvastatina em indivíduos brasileiros. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.*, v.41, p.127 - 131, 2009.
14. [doi](#) Valdes, P., **CERDA, A.**, Barrenechea, C., Kehrl, M., Soto, C., Salazar, LA. No association between common Gly972Arg variant of the insulin receptor substrate-1 and polycystic ovary syndrome in Southern Chilean women. *Clinica Chimica Acta* (Print). [JCB](#), v.390, p.63 - 66, 2008.

Artigos aceitos para publicação

1. [doi](#) WILLRICH, MARIA ALICE V., Rodrigues, Alice C., **Cerda, Alvaro**, Genvigir, Fabiana D.V., Arazi,

- Simone S., Dorea, Egidio L., Bernik, Marcia M.S., Bertolami, Marcelo C., FALUDI, ANDRE, LARGURA, ALVARO, BAUDHUIN, LINNEA M., BRYANT, SANDRA C., Hirata, Mario Hiroyuki, Hirata, Rosario Dominguez Crespo
Effects of atorvastatin on CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression in mononuclear cells and CYP3A activity in hypercholesterolemic patients. *Clinica Chimica Acta* (Print). **JCR**, 2013.
2. **doi>** REBELO, ANA CRISTINA S., VERLENGIA, ROZANGELA, KUNZ, VANDENI C., TAMBURUS, NAYARA Y., SILVA DE SÁ, MARCOS FELIPE, Hirata, Rosario D.C., Cerda, Alvaro, Hirata, Mario H., DA SILVA, ESTER
Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with autonomic modulation of heart rate in users and nonusers of oral contraceptives. *Contraception* (Stoneham). **JCR**, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CERDA, A., Hirata, Mario H, Hirata, RDC.
Anti-inflammatory effects of cholesterol-lowering drugs in TNF α -induced endothelial cells In: 6th Santorini Conference Biologie Prospective, 2012, Santorini, Grecia..
6th Santorini Conference Biologie Prospective 2012 Congress Abstracts. Drug Metabolism and Drug Interactions, 2012. v.27. p.A1 - A48
2. CERDA, A., Luchessi, AD, Hirata, Mario H, Hirata, RDC.
Clopidogrel downregulates TNF α -induced ICAM1 and IL8 expressions in endothelial cells In: 6th Santorini Conference Biologie Prospective, 2012, Santorini, Grecia..
Drug Metabolism and Drug Interactions, 2012. v.27. p.A1 - A48
3. Guimaraes, E. S., CERDA, A., Genvigir, FDV., Dorea, EL., Pinto, GA., Gosukuma, M. C., Hirata, Mario H, Hirata, RDC.
Expression of inflammatory response genes in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetes individuals treated with simvastatin and ezetimibe In: 6th Santorini Conference Biologie Prospective, 2012, Santorini, Grecia..
Drug Interaction and Drug Metabolism, 2012. v.27. p.A1 - A48
4. ZAMBRANO, T., CERDA, A., Hirata, Mario H., Hirata, RDC., Salazar, LA.
Expression of mir-33a/b in Hepatoma Cells treated with Atorvastatin In: 6th Santorini Conference Biologie Prospective, 2012, Santorini, Grecia..
Drug Metabolism and Drug Interactions, 2012. v.27. p.A1 - A48
5. CERDA, A., Genvigir, FDV., Guimaraes, E. S., Gusukuma, MC., Pinto, GA., Dorea, EL., Hirata, Mario H, Hirata, RDC.
Impact of cholesterol-lowering therapies on gene expression of adhesion molecules in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients In: American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, 2012, Los Angeles, CA..
2012 Abstract Supplement to Clinical Chemistry, 2012. v.58. p.A43 - A43
6. Hirata, RDC., CERDA, A., Momesso, M., Saba, B., SAMPAIO, MF., Castro, L.R., Lima, P. H. O., Wang, H. T. L., Fajardo, CM., OLIVEIRA, C. N. B., Silva, J. C., Menegueto, Z., Sousa, AGMR
influence CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 gene polymorphisms on warfarin therapeutic requirements in Brazilian individuals In: American Association for Clinical Chemistry, 2012, Los Angeles, CA..
2012 Abstract Supplement to Clinical Chemistry, 2012. v.58. p.A43 - A44
7. Kiyokawa, RK., MORAES, T. I., Oliveira, Raquel, CERDA, A., Hirata, Mario H., Fajardo, CM., Dorea, EL., Hirata, RDC.
Relationship of FTO common polymorphisms with metabolic syndrome and their influence on serum metabolic profile In: XVII Pharmaceutical Science and Technology Meeting, 2012, Sao Paulo, Brazil.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v.48. p.36 - 36
8. **doi>** CERDA, A., Genvigir, FDV., Rohde, CB., Issa, MH, Cavalli, SA, Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, MH, Hirata, RDC.
Atorvastatin and hormone replacement therapy affect expression of genes regulating the reverse cholesterol transport in mononuclear cells from postmenopausal women In: 79th Annual Congress of the European Atherosclerosis Society, 2011, Gothenburg.
Atherosclerosis. Supplement (Amsterdam). Atherosclerosis Supplements, 2011. v.12. p.45 - 45
9. Kiyokawa, RK., Oliveira, R., Morais, TI., CERDA, A., Hirata, MH, Fajardo, CM., Dorea, EL., JORGE, MEI., SAMPAIO, MF., Hirata, RDC.
Common variants of the fat mass and obesity associated gene influence metabolic profile in obese individuals In: XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2011, São Paulo.
BJPS XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011.
10. **doi>** Oliveira, R., Genvigir, FDV., CERDA, A., Willrich, MA, Dorea, EL., Bernik, MMS, Jorge, MIE, Fajardo, CM., Martinez, MB., Hirata, MH, Hirata, RDC.
Associação de polimorfismos dos genes LEP, LEPR e ADIPOQ com aumento da resistência à insulina em indivíduos obesos In: 29º Congresso brasileiro de endocrinologia e metabologia, 2010, Gramado.
29º Congresso brasileiro de endocrinologia e metabologia, 2010. p.S461 - S462
11. **doi>** Issa, MH, CERDA, A., Genvigir, FDV., Cavalli, SA, Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, MH, Hirata, RDC.
Atorvastatin down-regulates APOE mRNA expression in postmenopausal women In: Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010, Santorini.
Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010. Abstracts. CCLM, 2010. v.48. p.A68 - A68
12. **doi>** Luchessi, AD, Silbiger, VN, Hirata, RDC., CERDA, A., Carracedo, A, Brion, M, Iñiguez, A, Bravo, MS, Bastos, G, Sousa, AGMR, Hirata, MH
Clopidogrel response is affected by ABCB3 expression but not ABCB1 in CAD patients In: Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010, Santorini.
Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010. Abstracts. CCLM, 2010. v.48. p.A69 - A69
13. Willrich, MAV, Genvigir, FDV., Rodrigues, AC, ARAZI, S. S., Oliveira, R., CERDA, A., Dorea, EL., Bernik, MMS, Hirata, MH, Hirata, RDC.
CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression in hypercholesterolemic individuals under hypolipemiant therapy In: XV semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: FCF-USP, 2010. v.46. p.44 - 44
14. ANDERSON, J., CERDA, A., Hirata, MH, Hirata, RDC.
Effects of PCSK9 polymorphisms on serum lipids in response to atorvastatin in Brazilian population In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: FCF-USP, 2010. v.46. p.83 - 83
15. **doi>** CERDA, A., Genvigir, FDV., Rodrigues, AC, Arazi, SS., Oliveira, R., Dorea, EL., Hirata, MH, Hirata, RDC.
Influence of polymorphisms and cholesterol-lowering treatment on SCARB1 mRNA expression In: Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010, Santorini.
Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010. Abstracts. CCLM, 2010. v.48. p.A64 - A64
16. **doi>** Oliveira, R., Genvigir, FDV., CERDA, A., Dorea, EL., Bernik, MMS, Jorge, MIE, Fajardo, CM., Crema, D, Machado, JEA, Martinez, MB., Hirata, MH, Hirata, RDC.

Polymorphisms of the gene Lep, LEPR, AdipoQ and IL-6 and possible involvement in obesity and diabetes mellitus in Brazilian population In: Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010, Santorini. Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010. Abstracts. CCLM, 2010. v.48. p.A56 - A56

17. [doi:](#) CERDA, A., ARAZI, SS., GENVIGIR, FDV., HIRATA, MH, DOREA, EL., BERNIK, MMS, HIRATA, RDC. Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipids profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals In: IFCC WorldLab anual meeting, 2008, Fortaleza. Poster Abstracts – IFCC – WorldLab Fortaleza 2008. Berlin - New York: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2008. v.46. p.S571 - S572
18. CERDA, A., Barrenechea, C., Valdes, P., Salazar, LA. Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX región de La Araucanía In: XII Congreso Chileno de Tecnología Médica, 2004, Santiago. Livro de resúmenes do XII Congresso Chileno de Tecnologia Médica. , 2004. p.29 - 29

Apresentação de trabalho e palestra

1. Cerda, Alvaro, Genvigir, FDV., Guimaraes, E. S., Gosukuma, M. C., Pinto, G. A., Dorea, EL., Hirata, MH, Hirata, RDC. Impact of cholesterol-lowering therapies on gene expression of adhesion molecules in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. Hirata, RDC., CERDA, A., Momesso, M., Saba, B., SAMPAIO, MF., Castro, L.R., Lima, P. H. O., Wang, H. T. L., Silva, M. V., Fajardo, CM., OLIVEIRA, C. N. B., Silva, J. C., Menegueto, Z., Sousa, AGMR, Hirata, MH Influence CYP2C9, CYP2C19 and VKOR C1 gene polymorphisms on warfarin therapeutic requirements in Brazilian individuals, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. CERDA, A., Genvigir, FDV., Rohde, CB., Issa, MH, Cavalli, SA, Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, MH, Hirata, RDC. Atorvastatin and hormone replacement therapy affect expression of genes regulating the reverse cholesterol transport in mononuclear cells from postmenopausal women, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. Alves, C., CERDA, A., Hirata, RDC., Rodrigues, AC Fármacos hipolipemiantes e moléculas de adesão, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
5. Rohde, CB., CERDA, A., Genvigir, FDV., Hirata, RDC. Polimorfismos nos genes NPC1L1, ABCG5 e ABCG8 e a resposta ao tratamento com ezetimiba, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. Issa, MH, CERDA, A., Genvigir, FDV., Cavalli, SA, Bertolami, Marcelo C., Faludi, Andre A., Hirata, MH, Hirata, RDC. Atorvastatin down-regulates APOE mRNA expression in postmenopausal women, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
7. Luchessi, AD, Silbiger, VN, Hirata, RDC., CERDA, A., Carracedo, A, Brion, M, Iñiguez, A, Bravo, MS, Bastos, G, Sousa, AGMR, Hirata, MH Clopidogrel response is affected by ABCB3 expression but not ABCB1 in CAD patients, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. CERDA, A., Genvigir, FDV., Rodrigues, AC, ARAZI, SS., Oliveira, R., Dorea, EL., Hirata, MH, Hirata, RDC. Influence of polymorphisms and cholesterol-lowering treatment on SCARB1 mRNA expression, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. CERDA, A. Papel de genes implicados no transporte reverso do colesterol na resposta ao tratamento com hipolipemiantes, 2010. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
10. CERDA, A., ARAZI, SS., Genvigir, FDV., Hirata, MH, Dorea, EL., Bernik, MMS, Hirata, RDC. Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipid profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
11. CERDA, A., Barrenechea, C., Salazar, LA. Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico y controles de la IX Región de La Araucanía, 2004. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
12. Barrenechea, C., CERDA, A., Salazar, LA. Mutación Gly972Arg del gen IRS-1 y alteraciones metabólicas en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX región de La Araucanía, 2004. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
13. Barrenechea, C., CERDA, A., Salazar, LA. Acidosis Láctica y Diabetes: Una Revisión Actualizada, 2002. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. CERDA, A. Epigenética: Mecanismos e relação com mecanismos fisiopatológicos, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
2. CERDA, A., SILVA, J. L. 'Técnicas de Biologia Molecular em Análises Clínicas: Exercícios práticos' na disciplina Biologia Molecular em Análises Clínicas (FBC5709) do programa de PG em Farmácia, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
3. CERDA, A. 'Uso de ferramentas de Bioinformática nas Análises Clínicas' na disciplina Biologia Molecular em Análises Clínicas (FBC5709) do programa de PG em Farmácia, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
4. CERDA, A. Ferramentas de bioinformática aplicadas a estudos de associação genética, 2011. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
5. CERDA, A. 'Aplicações da bioinformática na área clínica' na disciplina Biologia Molecular em Análises Clínicas (FBC5709) do programa de PG em Farmácia, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

6. CERDA, A., Luchessi, AD
"Aplicações da PCR em tempo real na farmacogenômica" na disciplina Farmacogenômica Cardiovascular (FBC5708) do programa de PG em Farmácia, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, 2012. (Congresso)
Impact of cholesterol-lowering drugs on gene expression of adhesion molecules from mononuclear cells from hypercholesterolemic patients.
2. Apresentação Oral no(a) IV Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas, 2012. (Simpósio)
Papel de inibidores da síntese e absorção do colesterol na modulação de biomarcadores de inflamação e adesão celular in vitro e in vivo.
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) 79th annual congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), 2011. (Congresso)
Atorvastatin and hormone replacement therapy affect expression of genes regulating the reverse cholesterol transport in mononuclear cells from postmenopausal women.
4. Minicurso Next Generation Sequencing, 2011. (Oficina)
5. X Simpósio de Biossegurança e descarte de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa, 2011. (Simpósio)
6. III Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas, 2011. (Simpósio)
7. III Seminários Avançados em Tecnologia de Microarrays e Next Generation Sequencing, 2011. (Seminário)
8. VII Simpósio Lipídeos e Saúde: dos lipídios à prevenção da doença cardiovascular, 2011. (Simpósio)
9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010. (Congresso)
Influence of polymorphisms and cholesterol-lowering treatment on SCARB1 mRNA expression.
10. Apresentação Oral no(a) II Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas, 2010. (Simpósio)
Papel de genes implicados no transporte reverso do colesterol na resposta ao tratamento hipolipemiante.
11. II Simpósio de Atualização em Cultura Celular e Fermentação Bacteriana, 2009. (Simpósio)
12. Seminario para autores, 2009. (Seminário)
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) 20º IFCC-WorldLab, 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, 2008. (Congresso)
Scavenger receptor class B type I polymorphisms and its relation with serum lipids profile and response to atorvastatin in Brazilian individuals.
14. Quantitative real-time RT-PCR: Recent advances and new perspectives in mRNA quantification, 2008. (Seminário)
15. VII Simpósio de biossegurança e descarte de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa, 2007. (Simpósio)
16. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XII Congreso Chileno de Tecnología Médica, 2004. (Congresso)
Alteraciones metabólicas y moleculares en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico y controles de la IX Región de La Araucanía.
17. Apresentação Oral no(a) 1er Congreso Científico de Estudiantes de Tecnología Médica del Sur, 2004. (Congresso)
Mutación Gly972Arg del gen IRS-1 y alteraciones metabólicas en mujeres con síndrome de ovario poliquístico y controles de la IX región de La Araucanía.
18. Apresentação Oral no(a) I Jornada Científica de Estudiantes de Tecnología Médica, 2002. (Congresso)
Aldosis Láctica y Diabetes: Una Revisión Actualizada.

Organização de evento

1. CERDA, A.
III Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas, 2011. (Congresso, Organização de evento)

Citações

Web of Science

Total de trabalhos: 7

Total de citações: 17

Fator H: 3

Cerda, A.

SCOPUS

Total de trabalhos: 8 Total de citações: 20Cerdeira, A.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	14
Artigos aceitos para publicação	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	18
Apresentações de trabalhos (Congresso)	10
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	3

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (outro)	6
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	7
Participações em eventos (seminário)	3
Participações em eventos (simpósio)	7
Participações em eventos (oficina)	1
Organização de evento (congresso)	1

Outras informações relevantes

- 1 Membro suplente da Comissão de Bolsa do Programa de Pós-graduação em Farmácia - Análises Clínicas da FCFUSP (2009-2010).
Membro suplente da Comissão Coordenadora do Programa (CCP) de Pós-graduação em Farmácia - Análises Clínicas da FCFUSP (2009-2010).
Membro titular da Comissão Gestora (PROEX) do Programa de Pós-graduação em Farmácia - Análises Clínicas da FCFUSP (2009-2011)

Anexo 9. Artigo submetido para publicação

Title: Downregulation of monocyte adhesion molecules by inhibition of synthesis and absorption of cholesterol

Alvaro Cerda¹, Alice Cristina Rodrigues², Camila Alves¹, Fabiana Dalla Vecchia Genvigir¹, Cristina Moreno Fajardo¹, Egidio Lima Dorea³, Maria Cecilia Gusukuma³, Gelba Almeida Pinto³, Mario Hiroyuki Hirata¹, Rosario Dominguez Crespo Hirata¹

¹ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo. Sao Paulo, Brazil

² Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

³ University Hospital, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author:

Alvaro Cerda

Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

Av Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 17, 05508-900, Sao Paulo, SP, Brazil

Telephone: +55-11-3091 3660; Fax: +55-11-3813 2197

E-mail: alvarocerda@usp.br

Zimbra

alvarocerda@usp.br

A manuscript number has been assigned to "Downregulation of monocyte adhesion molecules by inhibition of synthesis and absorption of cholesterol"

De : Atherosclerosis <rmhasle@udl.ac.uk>

Sex, 05 de Abr de 2013 03:12

Remetente : ees.ath.0.205677.70997c84
<ees.ath.0.205677.70997c84@eesmail.elsevier.com>

Assunto : A manuscript number has been assigned to
"Downregulation of monocyte adhesion molecules by
inhibition of synthesis and absorption of cholesterol"

Para : alvarocerda@usp.br

Cc : alice-rodrigues@uol.com.br, cami alves09
<cami_alves09@yahoo.com.br>,
fdallavecchia@yahoo.com.br, fjdchris@yahoo.com.br,
egidiodr@gmail.com, mcgusukuma@gmail.com,
gelbaa@uol.com.br, mhhirata@usp.br,
rosariohirata@usp.br

Dear Mr Cerda,

Your submission entitled "Downregulation of monocyte adhesion molecules by inhibition of synthesis and absorption of cholesterol" has been assigned the following manuscript number: ATH-D-13-00328.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to EES as an author.
The URL is <http://ees.elsevier.com/ath/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Steve Eric Humphries, PhD
Editor in Chief
Atherosclerosis