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

Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos
no transporte reverso do colesterol

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo
2011

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

Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos
no transporte reverso do colesterol

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Versão corrigida da tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

G341e Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia
Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos
no transporte reverso do colesterol / Fabiana Dalla Vecchia
Genvigir. -- São Paulo, 2011.
141p.

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

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Lipídio : Bioquímica clínica 2. Expressão gênica
3. Farmacogenética I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo,
orientador.

616.0756 CDD

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no
transporte reverso do colesterol

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientadora/presidente

Dra. María José Brión Martínez
1º. examinador

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria
2º. examinador

Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare
3º. examinador

Dr. Egidio Lima Dorea
4º. examinador

São Paulo, 8 de setembro de 2011.

Ao Senhor, meu Deus, que me criou e tem cuidado de mim todo o tempo.

Ao meu esposo, Elias, à nossa filha, Luísa, e aos meus pais, Saleto e Carmelinda. São escolhidos do Senhor e, certamente, as pessoas mais preciosas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, prof^a. Tit. Rosario Dominguez Crespo Hirata. Obrigada pela oportunidade, pela confiança, pelo apoio em todos os momentos e pelo carinho. Você me ensinou muito e é para mim um exemplo de dedicação e amor à ciência.

Ao prof. Tit. Mario H. Hirata, por ter me acolhido tão bem no seu laboratório. Obrigada pelas conversas e pelos inúmeros conselhos.

Ao prof. Tit. Rui Curi, por ter sempre me recebido tão bem em seu laboratório, no Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP, em nome de seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF - USP, aos seus professores e funcionários, em nome de seu chefe, Prof^a. Tit. Marina Baquerizo Martinez.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida no período de julho de 2007 a julho de 2011.

Aos médicos da Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário (HU) da USP, em especial ao Dr. Egidio Lima Dorea.

Aos funcionários do Setor de coletas, do Laboratório de Análises Clínicas e da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do HU - USP.

À Cristina Moreno Fajardo, pelo apoio técnico e pela amizade.

Aos meus amigos da Igreja Batista em Pinheiros, em especial Jaila, Kátia, Sandra, Elba e Rodrigo. Tê-los conhecido foi uma bênção do Senhor. Obrigada por terem

dado tanto apoio a mim e ao meu esposo durante o tempo em que moramos em São Paulo.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF - USP.

A todos os funcionários e alunos do laboratório chefiado pelo prof. Tit. Rui Curi, no ICB -USP.

Aos pacientes, que contribuíram de maneira anônima para este estudo.

*“Aquele que não poupou o seu próprio Filho,
antes, por todos nós o entregou,
porventura, não nos dará graciosamente
com ele todas as coisas?”*

Romanos 8, 32

GENVIGIR, F. D. V. **Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol.** 2011. 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RESUMO

A eficácia das estatinas em reduzir o risco de eventos coronarianos não é completamente explicada por seus efeitos em diminuir colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Um dos seus efeitos adicionais pode ser decorrente da modificação na concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL), reconhecida como ateroprotetora, principalmente por seu papel no transporte reverso do colesterol (TRC). Os transportadores de membrana do tipo *ATP-binding cassette*, *ABCA1* e *ABCG1*, e o *scavenger receptor BI* (SRBI) são proteínas importantes envolvidas no TRC e seus genes são regulados por vários fatores de transcrição, entre eles os *liver-x-receptors* (LXRs). Com a finalidade de avaliarmos os efeitos dos hipolipemiantes sobre expressão dos transportadores ABC e do receptor SRBI, a expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H3* (LXR α) e *NR1H2* (LXR β) foi avaliada por PCR em tempo real em células das linhagens HepG2 (origem hepática) e Caco-2 (origem intestinal) tratadas com atorvastatina ou sinvastatina (10 μ M) e/ou ezetimiba (até 5 μ M) por até 24 horas. Além disso, a expressão desses genes também foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 50 pacientes normolipidêmicos (NL) e 71 hipercolesterolêmicos (HC) tratados com atorvastatina (10mg/dia/4semanas, n=48) ou sinvastatina e/ou ezetimiba (10mg/dia/4 ou 8 semanas, n=23). A possível associação entre os polimorfismos *ABCA1* C-14T e R219K e a expressão de RNAm em CMSP também foi avaliada por PCR-RFLP. O *SCARB1* foi o gene mais expresso nas células HepG2 e Caco-2, seguido por *NR1H2*, *NR1H3*, *ABCG1* e *ABCA1* em HepG2 ou por *ABCA1* e *ABCG1* em Caco-2. O tratamento com estatinas (1 ou 10 μ M) ou ezetimiba (5 μ M), por 12 ou 24 horas, aumentou a expressão de RNAm do *ABCG1*, mas não de *ABCA1* e *SCARB1*, em células HepG2. Ainda nesta linhagem, o aumento na transcrição dos genes *NR1H2* e *NR1H3* foi observado somente com a maior concentração de atorvastatina (10 μ M) e, ao contrário, o tratamento com ezetimiba causou redução na transcrição de *NR1H2*, sem alteração de *NR1H3*. Em células Caco-2, o tratamento com atorvastatina ou sinvastatina por 12 ou 24 horas reduziu a quantidade do transcrito *ABCA1* e não alterou a expressão do *SCARB1* e do *ABCG1*, embora, para este último, tenha havido uma tendência à diminuição da expressão após tratamento com sinvastatina (p=0,07). Após tratamento com ezetimiba isolada (até 5 μ M) nenhuma alteração de expressão de RNAm foi observada em células Caco-2; no entanto, após 24 horas de tratamento com sinvastatina e ezetimiba, foi reduzida a taxa de transcrição de *ABCA1* e *ABCG1*, mas não de *SCARB1*. Ao contrário das linhagens celulares, em CMSP os genes *NR1H2* e *ABCG1* foram os mais expressos, seguidos pelos genes *SCARB1* e *ABCA1* e, finalmente, pelo *NR1H3*. Indivíduos HC tiveram maior expressão basal de *NR1H2* e *NR1H3*, mas não de outros genes, quando comparados aos NL (p<0,05). Além disso, nos indivíduos HC, a expressão basal de *ABCA1* foi maior em portadores do alelo -14T do polimorfismo *ABCA1* -14C>T quando comparados aos

portadores do genótipo -14CC ($p=0,034$). O tratamento com estatinas, com ezetimiba ou com a terapia combinada diminuiu a transcrição de *ABCA1* e *ABCG1*. Para o *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3*, nenhuma alteração de expressão de RNAm em CMSP foi detectada após os tratamentos *in vivo*. Após todas as fases de tratamento, *ABCA1* e *ABCG1* e também *NR1H2* e *NR1H3* foram significativamente correlacionados entre si, mas nenhuma correlação com perfil lipídico sérico foi relevante. Coletivamente, esses resultados dão indícios de que os hipolipemiantes analisados (estatinas e ezetimiba) têm um importante papel na regulação da expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol e sugerem a existência de regulação tecido-específica para os dois transportadores ABC. Além disso, o efeito das estatinas ou da ezetimiba sobre a expressão do *ABCA1*, do *ABCG1* ou do *SCARB1* não sofreu influência de alterações diretas da transcrição dos LXRs.

Palavras-chave: Estatinas. Expressão gênica. Ezetimiba. LXR. SRBI. Transportadores ABC. Transporte reverso do colesterol.

GENVIGIR, F. D. V. **Statin effects on expression of genes involved in reverse cholesterol transport**. 2011. 141 f. Thesis (Ph.D. Degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ABSTRACT

The efficacy of statins in reducing the risk of coronary events is not completely explained by their effects in decreasing cholesterol low-density lipoprotein (LDL-C). One of their additional effects may result from the change in concentration of high-density lipoprotein (HDL), recognized as atheroprotective, mainly for the role in reverse cholesterol transport (RCT). The membrane transporters, as ATP-binding cassette, ABCA1 and ABCG1, and scavenger receptor BI (SRBI) are important proteins involved in the RCT and their genes are regulated by various transcription factors, including the liver-X-receptors (LXRs). In order to evaluate the effects of lipid lowering on expression of ABC transporters and SRBI receptor, the mRNA expression of *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H3* (LXR α) and *NR1H2* (LXR β) was assessed by real time PCR in HepG2 (hepatic origin) and Caco-2 (intestinal origin) cells treated with atorvastatin or simvastatin (10 μ M) and/or ezetimibe (up to 5 μ M) for 24 hours. Furthermore, the expression of these genes was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 50 normolipidemic (NL) and 71 hypercholesterolemic (HC) patients treated with atorvastatin (10mg/d/4 weeks, n = 48) or simvastatin and/or ezetimibe (10mg/d/4 or 8 weeks, n = 23). The possible association between *ABCA1* C-14T and R219K polymorphisms and mRNA expression in PBMC was also evaluated by PCR-RFLP. *SCARB1* was the most expressed in HepG2 and Caco-2 cells, followed by *NR1H2*, *NR1H3*, *ABCG1* and *ABCA1* in HepG2 or by *ABCG1* and *ABCA1* in Caco-2. The treatment with statins (1 or 10 μ M) or ezetimibe (5 μ M) for 12 or 24 hours, increased mRNA expression of *ABCG1* but not *ABCA1* and *SCARB1* in HepG2 cells. Moreover, in HepG2 cells, atorvastatin also upregulated *NR1H2* and *NR1H3* only at 10.0 μ M, meanwhile ezetimibe downregulated *NR1H2* but did not change *NR1H3* expression. In Caco-2 cells, atorvastatin or simvastatin treatment for 12 or 24 hours reduced the amount of *ABCA1* transcript and did not alter the *ABCG1* and *SCARB1* expressions, despite the tendency to decrease *ABCG1* mRNA expression after simvastatin treatment (p = 0.07). After treatment with ezetimibe alone (up to 5 μ M) no change in mRNA expression was observed in Caco-2 cells; however, after 24 hours- simvastatin and ezetimibe treatments decreased the transcription of *ABCA1* and *ABCG1*, but not of *SCARB1*. Unlike cell lines, in PBMC, *NR1H2* and *ABCG1* were the most expressed, followed by *SCARB1* and *ABCA1* and finally by the *NR1H3*. HC patients showed higher *NR1H2* and *NR1H3* basal expressions, but not of other genes, compared to NL (p <0.05). Moreover, in HC individuals, the *ABCA1* basal expression was higher in individuals carrying -14T allele of -14C> T polymorphism when compared with -14CC carriers (p = 0.034). Treatment with statins, ezetimibe, or combined therapy downregulated *ABCA1* and *ABCG1* expression. For *SCARB1*, *NR1H2* and *NR1H3*, no change in mRNA expression in PBMC was detected after treatments. After all phases of treatment, *ABCA1* and *ABCG1* as well as *NR1H2* and *NR1H3* were significantly correlated, but no correlation with serum lipid profile was relevant. Collectively, these results provide evidences that the lipid lowering (statins and

ezetimibe) have an important role in mRNA expression regulation of genes involved in reverse cholesterol transport and suggest the existence of tissue-specific regulation for the ABC transporters. Furthermore, the effect of statins or ezetimibe on *ABCA1*, *ABCG1* or *SCARB1* expression was not directly influenced by changes of LXR transcription.

Keywords: ABC transporters. Ezetimibe. Gene expression. LXR. Reverse cholesterol transport. SRBI. Statins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais funções das proteínas ABCA1, ABCG1 e SRBI no transporte reverso do colesterol	20
Figura 2 - Valores de eficiências de amplificação por qPCR para os genes (A) <i>ABCA1</i> ; (B) <i>ABCG1</i> ; (C) <i>SCARB1</i> ; (D) <i>NR1H2</i> ; (E) <i>NR1H3</i> ; (F) <i>UBC</i> ; (G) <i>GAPDH</i> ; (H) <i>HMBS</i>	42
Figura 3 - Perfil basal de expressão de RNAm dos genes estudados nas linhagens HepG2 e Caco-2.....	43
Figura 4 - Efeito do tratamento com atorvastatina e sinvastatina na expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> e <i>SCARB1</i> em células HepG2	45
Figura 5 - Efeito da atorvastatina e do ácido mevalônico lactona na expressão de RNAm do <i>ABCG1</i> em células HepG2.....	46
Figura 6 - Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão de RNAm do <i>NR1H2</i> e <i>NR1H3</i> em células HepG2.....	47
Figura 7 - Efeito do tratamento com ezetimiba na expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> , <i>SCARB1</i> , <i>NR1H2</i> e <i>NR1H3</i> em células HepG2	48
Figura 8 - Expressão da proteína ABCG1 em células HepG2 tratadas com estatinas	49
Figura 9 - Efeito do tratamento com estatinas na expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> e <i>SCARB1</i> em células Caco-2.....	50
Figura 10 - Efeito do tratamento com ezetimiba na expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> e <i>SCARB1</i> em células Caco-2	51
Figura 11 - Efeito do tratamento com ezetimiba e sinvastatina na expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> e <i>SCARB1</i> em células Caco-2	51
Figura 12 - Parâmetros bioquímicos séricos dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4semanas)	54
Figura 13 - Perfil de expressão de RNAm basal dos genes estudados em CMSP... ..	56
Figura 14 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes <i>ABCA1</i> e <i>ABCG1</i> (A), <i>ABCA1</i> e <i>SCARB1</i> (B) e <i>ABCG1</i> e <i>SCARB1</i> (C) em CMSP de indivíduos normolipidêmicos	57
Figura 15 - Correlação entre a expressão de RNAm basal dos genes <i>ABCA1</i> e <i>ABCG1</i> (A), e <i>NR1H2</i> e <i>NR1H3</i> (B) em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos	57
Figura 16 - Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> , <i>SCARB1</i> , <i>NR1H2</i> e <i>NR1H3</i> em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos	58
Figura 17 - Expressão de RNAm do <i>ABCA1</i> , <i>ABCG1</i> , <i>SCARB1</i> , <i>NR1H2</i> e <i>NR1H3</i> em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos (n=23), antes e após o tratamento com ezetimiba e sinvastatina	59
Figura 18 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes <i>ABCA1</i> e <i>ABCG1</i>	

(A), ABCA1 e SCARB1 (B), ABCG1 e SCARB1 (C) e NR1H2 e NR1H3 (D) em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos após o tratamento com atorvastatina	60
Figura 19 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes ABCA1 e ABCG1 e NR1H2 e NR1H3 em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos após o tratamento com ezetimiba e sinvastatina.....	61
Figura 20 - Efeito do polimorfismo C-14T do <i>ABCA1</i> sobre a expressão gênica em CMSP de indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos antes (Basal) e após o tratamento com atorvastatina (Atorva)	62
Figura 21 - Efeito do polimorfismo R219K do <i>ABCA1</i> sobre a expressão gênica em CMSP de indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos antes (Basal) e após o tratamento com atorvastatina (Atorva)	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na PCR quantitativa em tempo real.....	33
Tabela 2 - Características clínicas, variáveis antropométricas e perfil lipídico sérico basal dos indivíduos estudados	53
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com ezetimiba e sinvastatina	55

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Apo	Apolipoproteína
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
C _T	<i>Ciclo Threshold</i>
DAC	Doença arterial coronariana
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HC	Hipercolesterolêmicos
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HDL-C	Colesterol da HDL
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
HMGCoA	3-hidróxi-3metilglutaril Coenzima A
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDL-C	Colesterol da LDL
LDLR	Receptor de LDL
LXR	<i>Liver-X-Receptor</i>
NL	Normolipidêmicos
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Iodeto de propídio
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
qPCR	PCR quantitativa
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT	<i>Reverse transcription</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRBI	<i>Scavenger Receptor BI</i>
TRC	Transporte Reverso do Colesterol
UBC	Ubiquitina C
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Estudos in vitro.....	28
3.1.1 Cultivo das células HepG2 e Caco-2	28
3.1.2 Tratamento das células com hipolipemiantes	28
3.1.3 Efeito da sinvastatina na proliferação de células HepG2	29
3.1.4 Efeitos da sinvastatina sobre a viabilidade celular e fragmentação de DNA	29
3.1.5 Expressão de RNAm dos genes estudados	30
3.1.6 Expressão de ABCG1 por <i>Western Blotting</i>	34
3.2 Estudos in vivo	35
3.2.1 Casuística	35
3.2.2 Protocolos terapêuticos	36
3.2.3 Amostras biológicas	36
3.2.4 Análise de polimorfismos do <i>ABCA1</i>	37
3.2.5 Expressão de RNAm dos genes estudados	38
3.3 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Estudos in vitro.....	41
4.1.1 Efeito dos hipolipemiantes sobre a proliferação, viabilidade e fragmentação de DNA nas linhagens celulares.....	41
4.1.2 Expressão de RNAm basal nas linhagens celulares.....	41
4.1.3 Efeito de hipolipemiantes na expressão de RNAm e proteínas em células HepG2	43
4.1.4 Efeito de hipolipemiantes na expressão de RNAm em células Caco-2..	49
4.2 Estudos in vivo	52
4.2.1 Dados basais dos pacientes e resposta aos tratamentos farmacológicos	52
4.2.2 Expressão de RNAm basal em CMSP	55
4.2.3 Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de RNAm em CMSP	57
4.2.4 Associação entre expressão de RNAm e polimorfismos C-14T e R219K do <i>ABCA1</i>	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICES.....	89
ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO

HDL e o transporte reverso do colesterol

As reações que envolvem o transporte de colesterol sintetizado ou armazenado nas células periféricas, incluindo-se macrófagos presentes em vasos sanguíneos, para o fígado ou órgãos esteroidogênicos fazem parte do transporte reverso do colesterol (TRC) (KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006; LEWIS; RADER, 2005; VAN DER VELDE, 2010). O TRC é um dos principais mecanismos de atuação antiaterogênica da lipoproteína de alta densidade (HDL).

A biossíntese da HDL é um processo complexo e o seu metabolismo envolve a síntese e secreção dos principais componentes da partícula seguida da incorporação extracelular de lipídeos. As principais apolipoproteínas (apo) que constituem a HDL são a apo AI e a apo AII, mas outras lipoproteínas como a apo AIV, apo CI, apo CII, apo CIII, apo D e apo E também estão presentes. A apo AI é sintetizada no intestino e no fígado, porém, a contribuição relativa de cada órgão ainda é desconhecida (RADER, 2006; TABET; RYE, 2009). A supressão do gene que codifica a apo AI (*APOA1*) resulta em valores extremamente baixos de colesterol da HDL (HDL-C) em humanos. Enquanto que a superexpressão do *Apoa1* no fígado de camundongos aumenta significativamente os valores de HDL-C e inibe a progressão da aterosclerose (RADER, 2006; TOTH, 2009).

O efluxo de colesterol celular, parte importante do TRC, pode ser realizado por mecanismos passivos ou ativos. Entre os processos ativos estão aqueles que envolvem a interação da HDL ou de polipeptídeos anfipáticos, incluindo as apolipoproteínas, com os transportadores da família ATP-Binding Cassette (ABC) (CAVELIER et al., 2006). A superfamília ABC é composta de proteínas que realizam o transporte transmembrana de uma variedade de moléculas utilizando ATP como fonte de energia (AYE; SINGH; KEELAN, 2009).

A ABCA1 é um componente crítico na formação da HDL, papel particularmente importante no fígado e no intestino, e na realização do efluxo celular de fosfolipídeos e colesterol para apolipoproteínas, especialmente para a apo AI e, em menor proporção, para outras apolipoproteínas pobremente lipidadas como a apo E (KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006; LEE; PARKS, 2005; TALL, 2008;

ZANNIS; CHRONI; KRIEGER, 2006). A ABCA1 é uma proteína constituída de 2261 aminoácidos (SANTAMARINA-FOJO et al., 2000) e sua identificação como reguladora do metabolismo da HDL ocorreu com a descoberta de que mutações do gene *ABCA1* resultam na doença de Tangier, uma doença autossômica recessiva rara caracterizada por ausência de HDL plasmática, acúmulo de ésteres de colesterol em vários tecidos (fígado, baço, tonsilas e mucosa intestinal) e, frequentemente, por doença arterial coronariana (DAC) prematura (BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; NOFER; REMALEY, 2005). Mutações no *ABCA1* também podem resultar em Hipoalfalipoproteinemia Familiar que é caracterizada por baixas concentrações plasmáticas de HDL-C e ausência das manifestações clínicas da doença de Tangier (KLOS; KULLO, 2007).

As partículas de HDL nascentes, geradas pela ABCA1, sofrem várias modificações em uma série complexa de passos para aquisição de mais lipídeos e proteínas. Uma destas modificações é a esterificação do colesterol livre, pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT), e sua transferência para o centro lipídico da partícula de HDL, responsável pela formação de partículas esféricas maduras conhecidas como HDL₃ (menor e mais densa) e HDL₂ (maior e menos densa) (RADER, 2006). As partículas maduras de HDL circulantes podem continuar a receber colesterol livre dos tecidos periféricos por processo ativo ou passivo.

No processo ativo, há o envolvimento do transportador ABCG1, proteína de membrana constituída por 678 aminoácidos que também promove o efluxo unidirecional de colesterol (TALL, 2008; VELAMAKANNI et al., 2007). O silenciamento do *ABCG1*, em estudos com RNA de interferência, resultou em redução de efluxo de colesterol e fosfolipídeos para a HDL; ao contrário, sua super-expressão em células causou aumento do efluxo de colesterol para a HDL, mas não para a apo A1 livre em lipídeos, e redução da massa de colesterol celular (CAVELIER et al., 2006). Como foi sugerido, a ABCG1 parece alterar a distribuição de colesterol nas membranas celulares, permitindo a sua remoção pela HDL (VAUGHAN; ORAM, 2005). Por isso, o efluxo realizado por este transportador aparentemente não requerer a ligação direta a um aceptor.

No processo passivo, destaca-se o envolvimento do receptor *Scavenger BI* (SRBI). O SRBI é uma glicoproteína de membrana celular constituída por 509 aminoácidos e conhecida como um receptor multiligante, pois interage com uma ampla variedade de proteínas e lipídeos (RHAINDS; BRISSETTE, 2004; VAN ECK

et al., 2005). Esse receptor promove o fluxo bidirecional de colesterol livre entre as células periféricas e a partícula de HDL madura (VAN ECK et al., 2005). Sabe-se que esse efluxo é dependente de vários fatores, entre os quais a concentração do colesterol (VAN DER VELDE; GROEN, 2005; YANCEY et al., 2003). Essa função do SRBI é de conhecimento recente, visto que ele foi inicialmente caracterizado por sua habilidade em mediar, no fígado e em células esteroideogênicas, a captação seletiva de lipídeos da HDL madura, e outras lipoproteínas, sem a degradação da partícula (VAN ECK et al., 2005).

A via de captação de lipídeos, para subsequente excreção na bile ou produção de hormônios, mediada pelo SRBI, é um dos destinos metabólicos das HDL maduras. A outra via, conhecida como rota indireta, compreende a troca de ésteres de colesterol presentes no núcleo lipídico da HDL por triglicerídeos presentes nas lipoproteínas ricas em apo B, como as lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), modulada pela proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). Os ésteres de colesterol são posteriormente removidos da circulação por captação das lipoproteínas ricas em apo B por receptores de LDL (LDLR) presentes nos hepatócitos. Por sua vez, os triglicerídeos presentes na HDL sofrem a ação de enzimas, como a lipase hepática (HL) e a lipase endotelial (EL). Por fim, a remoção de lipídeos da HDL madura pelo SRBI ou pelas CETP, HL e EL, além de outros processos, é capaz de regenerar as partículas de apo AI livre ou pobremente associada a lipídeos e, então, reiniciar a geração da HDL (RADER, 2006).

Na **Figura 1**, estão esquematizadas as funções dos transportadores ABCA1, ABCG1 e do receptor SRBI no transporte reverso do colesterol.

Figura 1 - Principais funções das proteínas ABCA1, ABCG1 e SRBI no transporte reverso do colesterol

Nota: CH, colesterol; PL, fosfolípidos. Adaptado de Van Der Velde e Groen (2005).

A hipercolesterolemia e os inibidores de síntese e absorção de colesterol

A hipercolesterolemia é um fator de risco importante para o desenvolvimento da aterosclerose (STEINBERG, 2005), uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibróticos em grandes artérias e considerada uma das principais causas de DAC (LIBBY, 2002).

No corpo humano, o *pool* de colesterol é derivado de duas fontes: a principal é a síntese do colesterol que ocorre em especial no fígado; e a outra é a absorção, realizada no intestino. A contribuição relativa de cada uma dessas fontes para o colesterol plasmático é variável e depende de fatores fisiológicos, como predisposição genética e peso corpóreo, e terapêuticos (BAYS et al., 2008).

Uma estratégia farmacoterapêutica recente e efetiva para o tratamento da hipercolesterolemia consiste na inibição simultânea da síntese e da absorção do colesterol com fármacos que possuem mecanismo de ação complementar, como é o

caso da coadministração de uma estatina com a ezetimiba (GRIGORE; NORATA; CATAPANO, 2008).

As estatinas são potentes inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase que é a enzima-chave na síntese de colesterol. A inibição desta enzima resulta em diminuição da síntese endógena de colesterol, com consequente indução da expressão de LDLR e aumento da captação de partículas de LDL pelas células hepáticas e extra-hepáticas, reduzindo-se, assim, a colesterolemia (VAUGHAN; GOTTO JUNIOR, 2004).

Apesar do alvo primário das estatinas ser o colesterol da LDL (LDL-C), elas também reduzem as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em 7% a 30% (BAYS; STEIN, 2003). Além disso, seus efeitos benéficos são atribuídos não só a inibição da HMGCoA redutase, mas também à ação antiinflamatória e antiproliferativa, o que caracteriza os efeitos pleiotrópicos das estatinas. Entre esses efeitos podemos citar melhora da função endotelial, redução da inflamação vascular e aumento da estabilidade da placa aterosclerótica (WANG; LIU; LIAO, 2008).

Atualmente são disponíveis no mercado seis diferentes tipos de estatinas: lovastatina, sinvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina e rosuvastatina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007; VAUGHAN; GOTTO JUNIOR, 2004). Em sua maioria, as estatinas são biotransformadas primariamente por enzimas de fase I do citocromo P450 (VAUGHAN; GOTTO JUNIOR, 2004), passando a formar produtos hidroxilados que são, na fase II do metabolismo, conjugados com ácido glicurônico para formar intermediários glicuronidados (SCHMITZ; LANGMANN, 2006). Na fase III, os metabólitos gerados pela ação das enzimas de biotransformação de fase I e II podem ser eliminados através de transportadores apicais dos canalículos biliares (SCHMITZ; DROBNIK, 2003; SIEST et al., 2003).

A ezetimiba é um hipocolesteremiante que bloqueia a absorção de colesterol e fitoesterol nos enterócitos por inibição do transportador *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) (DAVIS; VELTRI, 2007; DAVIS JUNIOR; ALTMANN, 2009). Esse bloqueio não afeta a absorção de triglicerídeos, ácidos graxos, ácidos biliares ou vitaminas lipossolúveis (KOSOGLOU et al., 2005). A ezetimiba também pode interagir com o NPC1L1 hepático, modificando a concentração de colesterol biliar e podendo, portanto, alterar a quantidade de colesterol circulante (TEMEL et al., 2007).

Em modelos animais, a inibição da absorção do colesterol intestinal pela ezetimiba resulta em redução do colesterol de quilomícrons, com consequente diminuição do colesterol de remanescentes de quilomícrons que são removidos por receptores hepáticos (DAVIS; VELTRI, 2007). A redução do aporte de colesterol no fígado estimula a expressão de LDLR que resulta no aumento de captação de partículas de LDL e reduz a concentração de LDL-C no plasma (REPA et al., 2005). Interessantemente, foi demonstrado que a ezetimiba bloqueia a captação de LDL oxidada por macrófagos humanos e, além disso, bloqueia a expressão dos genes *ABCA1*, *ABCG1* e *APOE*, em macrófagos tratados com LDL oxidada, mas não com LDL acetilada (SEEDORF et al., 2004).

Em humanos, a ezetimiba é rapidamente absorvida e primariamente glicuronidada no intestino delgado e no fígado, com pouco metabolismo oxidativo mediado pelo citocromo P450. Tanto a ezetimiba quanto a sua forma glicuronidada sofrem recirculação entero-hepática, possuem uma meia vida de aproximadamente 22 horas e são excretadas pelas fezes (90%) e urina (10%). Como a ezetimiba não influencia a atividade das enzimas do citocromo P450, não são encontradas interações farmacocinéticas clinicamente significativas deste fármaco com as estatinas (DAVIS; VELTRI, 2007; KOSOGLOU et al., 2005).

A associação de estatinas com ezetimiba resulta em maiores reduções de concentrações plasmáticas de LDL-C, colesterol total e triglicerídeos. Portanto, é mais eficaz na prevenção e no tratamento da aterosclerose. Em um estudo, 3030 indivíduos hipercolesterolêmicos, com LDL-C acima da meta (estabelecida pelo *Adult Treatment Panel III* do *National Cholesterol Education Program* - NCEP ATP III) e sob tratamento com estatinas, tiveram redução adicional de 25% no LDL-C após tratamento concomitante com ezetimiba (PEARSON et al., 2005). Além disso, 71% dos pacientes tratados com terapia combinada alcançaram a meta de LDL-C, enquanto que apenas 20,6% dos tratados com estatina e placebo responderam dessa forma. O aumento modesto de HDL-C também foi observado na terapia combinada com ezetimiba.

A busca de novas estratégias ou agentes farmacológicos que visem o aumento da HDL-C tem intrigado a comunidade científica mais recentemente, pois, mais obstatante reduzindo-se as concentrações de LDL-C abaixo de 100mg/dL, o risco de eventos cardiovasculares em pacientes com DAC permanece em cerca de 9% ao ano (HAUSENLOY; YELLON, 2008). Podem-se citar como novas estratégias a

infusão de HDL mimetizada; novos agonistas de *peroxisome proliferator-activated receptor* α (PPAR α), como o genfibrozil, o fenofibrato e o bezafibrato; agonistas de *liver-X-receptor* α (LXR α), entre os quais as tiazolidinedionas que têm demonstrado aumento na expressão de ABCA1 e ABCG1; e os inibidores da CETP que, apesar de não demonstrarem resultados promissores nos ensaios clínicos iniciais com torcetrapib, continuam sendo uma alternativa a ser considerada (TOTH, 2009).

No entanto, essas novas estratégias apresentam inconvenientes que ainda não tornam possível a sua inserção ou permanência na prática clínica. Na realidade, o que essas experiências têm demonstrado é que ainda há muito a ser elucidado a respeito do complexo mecanismo de regulação da HDL.

Farmacogenética de hipolipemiantes

O efeito combinado das múltiplas variantes genéticas das proteínas que regulam o TRC poderia explicar variações no tamanho, forma e concentração da HDL. Surpreendentemente, existe informação limitada da participação de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do TRC na resposta ao tratamento com hipolipemiantes.

O gene que codifica a ABCA1 está localizado no cromossomo 9 e é composto por 50 éxons, 49 dos quais são codificadores da proteína (SANTAMARINA-FOJO et al., 2000). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -477C>T do *ABCA1* foi associado com diferenças nas concentrações de apo AI em indivíduos tratados com fluvastatina (LUTUCUTA et al., 2001). Por outro lado, em indivíduos holandeses tratados com pravastatina não houve associação entre o SNP *ABCA1* -14C>T e progressão de aterosclerose (ZWARTS et al., 2002). Nós também não encontramos relação dos SNPs -14C>T, -105C>T e R219K do *ABCA1* com resposta ao tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4semanas) (GENVIGIR et al., 2008).

O gene ABCG1 localiza-se no cromossomo 21 e é composto por 23 éxons (LORKOWSKI et al., 2001). Embora tenha sido descrita a participação da ABCG1 no TRC e no metabolismo da HDL, até o momento não temos informações sobre a relação entre variantes do *ABCG1* e a resposta ao tratamento com hipolipemiantes.

O gene que codifica o SRBI (*SCARB1*) localiza-se na região 12q24, tem 86 kb e é composto por 13 éxons (RHAINDS; BRISSETTE, 2004). Há também poucos

estudos sobre a farmacogenética desse receptor. No estudo *Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network* (GOLDN) foi observado que indivíduos da população geral portadores da variante *SCARB1* c.4G>A apresentavam maior redução de triglicerídeos sérico e aumento de HDL-C após tratamento com fenofibrato (LIU et al., 2008). Recentemente, nós observamos que o SNP *SCARB1* c.1050C>T foi relacionado com redução mais acentuada de LDL-C e apo B, após tratamento com atorvastatina, em uma amostra de nossa população (CERDA et al., 2010).

Hipolipemiantes e expressão de ABCA1, ABCG1 e SCARB1

O *ABCA1* é largamente expresso em tecidos animais (KIELAR et al., 2001, WELLINGTON et al., 2002) e, além do colesterol, várias outras substâncias naturais ou sintéticas e reguladores metabólicos, como ligantes de PPARs, LXR α , LXR β , *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2* (SREBP2), hormônios, citocinas e fármacos, também influenciam a transcrição do *ABCA1*, sugerindo um sofisticado mecanismo transcricional para este gene (SCHMITZ; LANGMANN, 2005).

Os efeitos de estatinas na modulação da expressão de *ABCA1* foram avaliados em diferentes tipos celulares com resultados discrepantes. Em células de hepatoma de rato (Fu5AH), a pitavastatina e a compactina induziram efluxo de colesterol e fosfolídeos para a apo AI (ZANOTTI et al., 2004). Já, em células de linhagem de hepatoma humano, HepG2, a pitavastatina e a fluvastatina aumentaram a expressão de RNAm do *ABCA1* (MAEJIMA et al., 2004; SONE et al., 2004). No entanto, outros autores não constatarem alterações de expressão de RNAm e proteína *ABCA1* em células HepG2 e em tecido hepático de camundongos tratados com pravastatina ou em células de hepatoma de ratos (McARH7777) tratadas com compactina (ANDO et al., 2004; TAMEHIRO et al., 2007). O tratamento com fluvastatina (20mg/dia) ou atorvastatina (80mg/dia), por quatro semanas antes da cirurgia, também não modificou a expressão hepática de *ABCA1*, em indivíduos normocolesterolêmicos portadores de cálculo biliar (PARINI et al.; 2008).

Em células Swiss 3T3 (linhagem celular de fibroblastos de camundongo), em HEK293 (célula humana embrionária de rim 293) e, *in vivo*, em leucócitos de camundongos não foram detectadas alterações de expressão de RNAm do *ABCA1*

após tratamento com fluvastatina ou pravastatina (ANDO et al., 2004; SONE et al., 2004). Já em macrófagos murinos e humanos, várias estatinas regularam negativamente a expressão de *ABCA1* (ANDO et al., 2004; SONE et al., 2004; WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et al., 2008b) e a compactina também diminuiu o efluxo de colesterol em macrófagos THP-1 e HMDM (WONG; QUINN; BROWN, 2004). No entanto, em macrófagos THP-1, foi observado aumento de efluxo de colesterol para a apo AI, induzido por sinvastatina e atorvastatina, e aumento da expressão de RNAm do *ABCA1* induzido por atorvastatina (ARGMANN et al., 2005). A sinvastatina (5-10mg/dia) também aumentou a expressão de RNAm do *ABCA1*, em células mononucleares de indivíduos com diabetes tipo 2 (GUAN et al., 2008).

Com relação a estudos com ezetimiba, em um experimento com camundongos alimentados com dieta rica em colesterol, o aumento da quantidade de colesterol da dieta foi associado a um aumento da expressão do *Abca1* na mucosa jejunal sem que esta expressão tenha sido alterada pelo tratamento com um análogo da ezetimiba; exceto na dieta com menor quantidade de colesterol onde foi observada uma diminuição da expressão do *Abca1* com o tratamento (REPA; DIETSCHY; TURLEY, 2002). Os mesmos autores mostraram que no tecido hepático não houve modificação da expressão do gene, com ou sem tratamento com o análogo da ezetimiba.

A *ABCG1* é expressa em macrófagos, pulmão, baço, placenta, cérebro, tecidos fetais, fígado e em muitos outros tecidos (SABOL; BREWER JUNIOR; SANTAMARINA-FOJO, 2005; SCHMITZ; LANGMANN, 2005). Vários compostos que regulam a expressão do *ABCA1* também são capazes de modular a expressão de RNAm do *ABCG1*, destacando-se o fato de lipídeos naturais ou sintéticos serem os moduladores transcricionais de maior efetividade (BALDÁN et al., 2006; SCHMITZ; LANGMANN, 2005; VELAMAKANNI et al., 2007). Essa modulação ocorre principalmente por ação de LXR α e LXR β (SCHMITZ; LANGMANN, 2005).

Aumento da expressão de RNAm do *ABCG1* foi observado em macrófagos THP-1 tratados com atorvastatina (ARGMANN et al., 2005). No entanto, redução da expressão desse gene foi encontrada em macrófagos murinos RAW264.7 tratados com pravastatina (ANDO et al., 2004) e em macrófagos humanos (THP-1 e HMDM) tratados com vários tipos de estatinas (WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et

al., 2008b). Não é de nosso conhecimento o relato de estudos sobre o efeito da ezetimiba sobre a expressão de ABCG1.

Estudos em humanos, camundongos e ratos mostraram alta expressão de SRBI em glândulas adrenais, ovários e fígado e menor expressão em outros órgãos ou tecidos como coração, intestino e glândula mamária (RHAINDS; BRISSETTE, 2004).

O *SCARB1* tem sua expressão regulada por colesterol celular e por outros compostos, como hormônios, citocinas e outros (RHAINDS; BRISSETTE, 2004; TRIGATTI; RIGOTTI; KRIEGER, 2000). Em macrófagos murinos e humanos tratados com pitavastatina, foi observado aumento de expressão de RNAm e proteína SRBI (HAN et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em queratinócitos humanos tratados com sinvastatina (TSURUOKA et al., 2002) e em monócitos humanos em diferenciação tratados com atorvastatina (LLAVERIAS et al., 2006). O aumento do efluxo mediado pelo SRBI em células de hepatoma Fu5AH tratadas com sinvastatina foi também relatado (FRANCESCHINI et al., 2007). Em cães, espécie sem atividade da CETP, o tratamento com atorvastatina não alterou a expressão proteica de SRBI no fígado (BRIAND et al., 2006). A sinvastatina (5-10 mg/dia) também não alterou a expressão de *SCARB1* em estudos *in vivo* com células mononucleares de indivíduos diabéticos (GUAN et al., 2008).

Buscando-se reduzir o risco remanescente de doenças cardiovasculares (HAUSENLOY; YELLON, 2008), é de grande interesse a busca do conhecimento de como os medicamentos hipolipemiantes podem influenciar no metabolismo da HDL. Os inibidores de síntese e absorção do colesterol podem alterar a concentração de colesterol intracelular, o qual é reconhecidamente um componente crítico para a regulação da expressão de ABCA1, ABCG1 e SRBI. Portanto, considerando o importante papel dessas proteínas no metabolismo da HDL, é importante conhecer como estes fármacos influenciam a expressão destas proteínas em modelos de células hepáticas e intestinais humanas, principais sítios de formação de HDL, e também em células periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

2.1.1. Avaliar os efeitos de estatinas e ezetimiba na expressão de *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *LXRβ* (*NR1H2*) e *LXRα* (*NR1H3*), em linhagens celulares de hepatócitos e enterócitos e em células mononucleares de indivíduos hipercolesterolêmicos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudar o efeito de estatinas e ezetimiba sobre a expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *LXRβ* (*NR1H2*) e *LXRα* (*NR1H3*) em linhagens celulares HepG2 e Caco-2.

2.2.2 Avaliar a expressão de RNAm dos genes *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *LXRβ* (*NR1H2*) e *LXRα* (*NR1H3*) em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normolipidêmicos.

2.2.3 Estudar o efeito de estatinas e ezetimiba na expressão do RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *LXRβ* (*NR1H2*) e *LXRα* (*NR1H3*) em células mononucleares do sangue periférico de hipercolesterolêmicos.

2.2.4 Avaliar os efeitos dos polimorfismos *ABCA1* C-14T (rs1800977) e R219K (rs2230806) sobre a expressão gênica de indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com estatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudos *in vitro*

3.1.1 Cultivo das células HepG2 e Caco-2

As linhagens derivadas de hepatoma humano (HepG2, número ATCC® HB 8065) e de adenocarcinoma colorretal (Caco-2, número ATCC® HTB-37), ambas obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil), foram mantidas em *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, pH 7,4) com 10 % de soro fetal bovino, a 37° C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de gás carbônico. O meio de cultivo foi suplementado com L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 44 mM, estreptomicina 10.000 µg/mL e penicilina 10.000 UI/mL. O meio foi trocado duas vezes por semana e as células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) e subcultivadas uma vez por semana.

3.1.2 Tratamento das células com hipolipemiantes

A atorvastatina e a ezetimiba, gentilmente doadas pela Pfizer Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil) e pela Merck/Schering-Plough (Nova Jersey, EUA), foram dissolvidas em metanol ou etanol PA, respectivamente, (Merck S.A., São Paulo, Brasil). A sinvastatina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi dissolvida também em etanol PA (Merck S.A., São Paulo, Brasil) e foi ativada de acordo com o seguinte protocolo, conforme Sadeghi e colaboradores (2000): hidróxido de sódio 0,1N foi adicionado à solução que, em seguida, foi incubada a 50 °C por 2 horas. O pH foi então ajustado para 7,0 com ácido clorídrico e a concentração final da solução foi ajustada para 5,6 mM.

A concentração final de metanol e etanol no meio de cultura nunca excedeu 0,1 e 0,2%, respectivamente. Experimentos preliminares com estas concentrações não mostraram citotoxicidade. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM na ausência (controle metanol ou etanol) e na presença de concentrações

variáveis de atorvastatina (0,1 a 20 μM), sinvastatina ácida (0,01 a 10 μM) e/ou ezetimiba (0,5 a 5 μM). As células tratadas foram visualizadas no microscópio para análise morfológica.

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

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

3.1.3 Efeito da sinvastatina na proliferação de células HepG2

Ensaio de curvas de crescimento foram realizados em duplicata em três experimentos independentes, a partir de suspensões de células (1×10^5 células) semeadas em placas de 6 poços com volume final de 2 mL de meio de cultura DMEM. As células foram mantidas em cultura durante cinco dias, na ausência e na presença de concentrações variáveis de sinvastatina ácida (0,01 a 10 μM), havendo sido tratadas no tempo 0 de cultivo. O número de células foi determinado a cada 24 horas por microscopia óptica, utilizando-se a câmara de Neubauer.

3.1.4 Efeitos da sinvastatina sobre a viabilidade celular e fragmentação de DNA

A porcentagem de células viáveis foi avaliada após tratamento com sinvastatina por até 72 horas por citometria de fluxo, utilizando-se iodeto de propídio (PI) como marcador. Suspensões de células (1×10^5 células) foram semeadas em placas de 6 poços com volume final de 2 mL de meio de cultura DMEM e incubadas

com diferentes concentrações de sinvastatina por até 72 horas. Uma solução de PI (20 µg/mL em tampão salina fosfato – PBS pH 7,2-7,4) foi adicionada para análise da fluorescência incorporada. Foram realizados de 3 a 6 experimentos independentes, em duplicata.

A quantificação de DNA fragmentado também foi realizada por citometria de fluxo, de acordo com o método descrito por Nicoletti e colaboradores (1991). Brevemente, 5×10^5 células foram ressuspensas em 0,2 mL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100) com 20 µg/mL de PI. As células lisadas foram incubadas no escuro *overnight* a 4°C e utilizadas para a análise de fragmentação do DNA.

A fluorescência emitida foi quantificada em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando-se o software *Cell Quest* (Becton Dickinson, CA, EUA). Para cada teste, foram avaliados dez mil eventos.

3.1.5 Expressão de RNAm dos genes estudados

3.1.5.1 Isolamento e avaliação do RNA total

O RNA foi extraído a partir de uma suspensão de células HepG2 ou Caco-2 com 5 a 10×10^6 células/mL, lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL® (Life Technologies Brasil / Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (CHOMCZYNSKY, 1993). Resumidamente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados 12.000 g, 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 g, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi secado em temperatura ambiente, ressuspendido em 100µL de água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), incubado por 10 min a 56°C e armazenado a –70°C para posterior análise.

O RNA total isolado foi quantificado (260nm) e foi avaliado o seu grau de pureza (A_{260nm}/A_{280nm}) por espectrofotometria no UV (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) com a utilização do equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). A integridade do RNA de algumas amostras foi avaliada com a

utilização da plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha).

3.1.5.2 Expressão gênica nas linhagens celulares

Para os experimentos de análise de expressão de RNAm, as células HepG2 foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células por 75 cm^2 , cultivadas por 24 horas e então tratadas com sinvastatina (0 a $10 \mu\text{M}$), atorvastatina (0 a $10 \mu\text{M}$) ou ezetimiba (0 a $5 \mu\text{M}$) por até 24 horas. As células Caco-2 foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células por 75 cm^2 , cultivadas por 2 dias e então tratadas com atorvastatina (0 a $1 \mu\text{M}$), sinvastatina (0 a $1 \mu\text{M}$) e/ou ezetimiba (0 a $5 \mu\text{M}$) 12 ou 24 horas.

A expressão do RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* nas linhagens celulares foi quantificada através da reação de transcrição reversa (RT) seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) em tempo real. Em paralelo, foi medida a expressão de RNAm dos genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) ou hidroximetilbilano sintase (*HMBS*), como referência endógena, para estudo de expressão em HepG2 e Caco-2, respectivamente. A escolha do gene de referência endógena para cada tipo celular foi realizada utilizando-se o programa geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), conforme padronizado e previamente descrito por nossa equipe (RODRIGUES, 2008).

O cDNA foi gerado a partir de $2 \mu\text{g}$ de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil), ditiotretol (DTT) a 10 mM (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil), dNTPs a $500 \mu\text{M}$ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200 U de transcriptase reversa (SuperScriptTM II Reverse Transcriptase RNase H⁻) e tampão de RT [Tris-HCl a 250 mM (pH 8,3), KCl a 375 mM e MgCl_2 15 mM] (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min e 70°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Os ensaios de amplificação pela qPCR foram realizados individualmente, utilizando-se o equipamento automatizado ABI Prism 7500 Fast (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Para os genes ABCA1, ABCG1, SCARB1, NR1H2 e NR1H3, as sequências dos iniciadores e das sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidas em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “*Assay by design*” (ABCA1) ou “*Assay on demand*” (demais genes) (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As sequências dos iniciadores de referência endógena foram gentilmente cedidas pela Dra Nancy Amaral Rebouças (*GAPDH*) (ICB/USP) ou foram previamente descritos na literatura (*HMBS*) (VANDESOMPELE et al., 2002). Por sua vez, as sondas dos genes de referência endógena (*GAPDH* e *HMBS*) foram selecionadas utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (**Tabela 1**).

As reações de amplificação foram realizadas com 1X TaqMan[®] Gene Expression Assay (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) para os genes ABCA1, ABCG1, SCARB1, NR1H2 e NR1H3 ou com 250 nM de sonda e 300 nM de cada iniciador (*sense* e *antisense*), no caso dos genes HMBS e GAPDH, 1X TaqMan[®] Universal PCR master mix (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e 1 µL do cDNA, num volume total de 10 µL. Somente para o estudo de expressão do gene ABCA1 em células HepG2, foram utilizados 3 µL do cDNA e volume final de 25 µL. As condições de termociclagem da qPCR foram: 50^oC por 2 min, 95^oC por 10 min e 40 ciclos de 95^oC por 15 s e 60^oC por 1 min.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na PCR quantitativa em tempo real

Gene	Iniciador / Ensaio*	Sequência (5' → 3')
ABCA1	Sense	GCTGCATAGTCTTGGGACTCT
	Antisense	CGCATGTCACTCCAGCTTCT
	Sonda	FAM TM ATGCTGAACAGCTCCTG MGBNFQ
ABCG1	Hs01555189_m1	(Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) Fluoróforos: 5'FAM TM e 3'NFQ-MGB
SCARB1	Hs00194092_m1	(Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) Fluoróforos: 5'FAM TM e 3'NFQ-MGB
NR1H2	Hs00173195_m1	(Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) Fluoróforos: 5'FAM TM e 3'NFQ-MGB
NR1H3	Hs00172885_m1	(Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) Fluoróforos: 5'FAM TM e 3'NFQ-MGB
GAPDH	Sense**	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
	Antisense**	CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC
	Sonda	VIC [®] TCAGCCTTGACGGTGC MGBNFQ
HMBS	Sense [#]	GGCAATGCGGCTGCAA
	Antisense [#]	GGGTACCCACGCGAATCAC
	Sonda	VIC [®] CGGAAGAAAACAGCC MGBNFQ

Nota: * Para iniciadores e sondas adquiridos pelo serviço “Assay on demand” (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). ** Sequências de iniciadores gentilmente cedidas pela Dra Nancy Amaral Rebouças. [#] Sequências de iniciadores previamente descritas (VANDESOMPELE et al., 2002). FAMTM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; MGB, *minor groove binder*; NFQ, *non-fluorescent quencher*; VIC[®], 6-carboxirodamina.

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

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

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

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Por esse método, a quantidade de transcrito calculada para cada gene em uma amostra é normalizada pela do respectivo gene de referência endógena. As duas seguintes fórmulas foram utilizadas:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta C_T} \text{ (Expressão basal de todos os genes) e}$$

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

Onde: $\Delta C_T = C_T$ gene de interesse - C_T gene constitutivo

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ da amostra tratada - ΔC_T da amostra controle

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

3.1.6 Expressão de ABCG1 por *Western Blotting*

As proteínas foram extraídas a partir de uma suspensão de células HepG2 com aproximadamente 10×10^6 células/mL. A suspensão celular foi lavada com PBS, centrifugada a 1500 rpm por 10 min e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (50mM Tris-HCl [pH 8,0]; 1% Triton X-100; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS); 150mM NaCl; 2ug/mL de aprotinina; 5-10ug/mL leucopeptina; 1ug/mL pepstatina A; 1mM PMSF; 5mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM Na_3VO_4 ; 5-10mM NaF) por 30 min em gelo. As células foram agitadas em agitador de tubos, à velocidade máxima por 1 min e então centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), segundo Sambrook e Russel (2001). Uma alíquota com 50 µg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl 100mM pH 6,8; mercaptanol 5%; SDS 2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%) foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes. As proteínas fracionadas em gel foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad Laboratórios Brasil, SP, Brasil) em cuba de eletroforese (250 mA por 1 h). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de PVDF em Ponceau S 0,2% por 5 min.

A detecção de ABCG1 foi realizada inicialmente por bloqueio da membrana de PVDF por 2 horas a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBS

[Tris-HCl 20 mM, (pH 7,5), NaCl 0,9%] para minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, a membrana foi incubada, sob agitação, em leite desnatado 5% com TBST (TBS com 0,1% de Tween 20) com o anticorpo policlonal de cabra anti-ABCG1 humano diluído 1:150 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou anticorpo monoclonal de camundongo anti-B-actina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) diluído 1:20.000 *overnight*. Após 3 lavagens por 10 min com TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo de asno anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, diluído 1:5.000, ou com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo também conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), diluído 1:10.000, por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 min com TBST. As bandas marcadas pelos anticorpos foram visualizadas utilizando-se “kit ECL western blot detection reagents” (GE Healthcare do Brasil Ltda, SP, Brasil).

3.2 Estudos *in vivo*

3.2.1 Casuística

Foram selecionados 71 indivíduos hipercolesterolêmicos (HC) indicados para serem tratados com hipolipemiantes (colesterol total > 200 mg/dL, LDL-C > 160mg/dL, triglicerídeos < 350 mg/dL), após período de 4 semanas sob dieta com baixo teor de colesterol e gordura saturada (CHAHOU; AUDE; MEHTA, 2004), e 50 indivíduos normolipidêmicos (NL) segundo os critérios da IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007), na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP).

Os indivíduos selecionados foram convidados a participar do projeto pelo pesquisador responsável ou por um dos colaboradores que explicou o seu conteúdo. Os que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os protocolos de pesquisas foram aprovados pelos comitês de ética do HU/USP, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) / USP e também pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, n. 1360/2004 e n. 766/2005, **Anexo A**).

Não foram incluídos, nesse estudo, os indivíduos que se declararam orientais, indivíduos com doenças cardiovasculares, com alguma forma de hipercolesterolemia secundária, doença tireoideana, hepática ou renal grave ou diabetes melito conhecidos antes ou após a avaliação laboratorial e mulheres grávidas ou que estivessem usando contraceptivos orais.

3.2.2 Protocolos terapêuticos

Os indivíduos HC incluídos nesse estudo foram separados em dois grupos. Um grupo (n=48) foi tratado com atorvastatina (HC-AT) com dose diária de 10 mg por via oral durante quatro semanas. O outro (n=23), denominado HC-SE, foi tratado com ezetimiba (10 mg/dia/via oral) por quatro semanas; sinvastatina (10 mg/dia/via oral) por oito semanas e terapia combinada (sinvastatina + ezetimiba) por mais quatro semanas. O maior tempo de tratamento (oito semanas) com a sinvastatina isolada foi necessário para a exclusão de possíveis efeitos residuais da terapia inicial com ezetimiba.

3.2.3 Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue, após jejum de 12 a 14 h, no período basal e após cada fase do protocolo de tratamento com hipolipemiantes. Para extração de DNA e RNA, foram obtidos 16 mL de sangue em tubo a vácuo do tipo BD Vacutainer® (BD Diagnostics, São Paulo, BR), com EDTA K2 jateado na parede do tubo e 5 mL em tubo seco com gel separador e ativador de coágulo jateado na parede do tubo (Gel SST II® Advance, BD Diagnostics, São Paulo, BR) para a obtenção de soro.

Foram determinadas concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicerídeos, apo A1 e apo B. As determinações bioquímicas aqui descritas foram realizadas no Serviço de Laboratório Clínico do HU/USP ou no Laboratório Álvaro - Centro de Análises e Pesquisas Clínicas (Cascavel, PR). As determinações de colesterol total e frações, triglicerídeos, apo A1 e apo B séricos foram utilizadas a fim de avaliar a resposta aos hipolipemiantes.

3.2.4 Análise de polimorfismos do *ABCA1*

3.2.4.1 Extração e análise de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando-se o método de precipitação salina desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR et al., 1998). Resumidamente, as amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10 mM (pH 8,0), KCl a 10 mM; $MgCl_2$ a 10 mM e EDTA a 2 mM] acrescido de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0 e NaCl a 0,4M) acrescido de SDS 10%. A seguir, foi adicionado NaCl a 5M e a suspensão foi centrifugada durante 5min a 12.000rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto, e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5min a 12.000rpm, lavado com etanol 70% e ressuspenso em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10 mM e EDTA 1mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a $-20^{\circ}C$.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando-se tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, 60 mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, BR). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 1.000 pares de bases (1Kb) (Life Technologies Brasil / Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) com a utilização do equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA).

3.2.4.2 Genotipagem dos polimorfismos ABCA1 C-14T e R219K

Os polimorfismos C-14T e R219K do gene ABCA1 foram analisados nos indivíduos dos grupos NL e HC-AT, por PCR seguida de análise do perfil de restrição enzimática (RFLP), conforme previamente publicado por nosso grupo (GENVIGIR et al., 2008). Resumidamente, com 100 ng de DNA genômico obtido do sangue total periférico de humanos, foram amplificados, separadamente, segmentos do gene que continham os polimorfismos. Os produtos da PCR foram digeridos pelas endonuclease de restrição *BsmAI* (C-14T) e *StyI* (R219K). Os fragmentos de restrição foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%.

3.2.5 Expressão de RNAm dos genes estudados

3.2.5.1 Isolamento e avaliação do RNA total

O RNA foi extraído de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) que foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, MO, EUA) densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (SALAZAR; HIRATA; HIRATA, 2000). Resumidamente, 5 mL de sangue colhido em EDTA foram diluídos 1:2 (v/v) com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4, e EDTA 10 mM, pH 8,0). A seguir, esse volume foi cuidadosamente pipetado sobre 3,5 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, MO, EUA) contido em tubo cônico de 15 mL que foi centrifugado a 1400 rpm, 30 min, em temperatura ambiente. As células mononucleares foram recolhidas, lavadas 3 vezes com o dobro do seu volume com tampão Tris-EDTA, contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

As CMSP (1 a 5×10^6 células) foram então lisadas com 1 mL de TRIZOL^R (Life Technologies Brasil / Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com o mesmo procedimento executado para as linhagens celulares HepG2 e Caco-2 e já descrito no item 3.1.5.1. Ao final do procedimento, o RNA foi secado em temperatura ambiente, ressuspendido em 50µL de água esterilizada tratada com DEPC (Sigma-Aldrich, MO, EUA), incubado por 10 min a 56°C e armazenado a -70°C. A quantificação e a integridade do RNA foram avaliadas de acordo com o item 3.1.5.1.

3.2.5.2 Expressão gênica nas CMSP

Os estudos de expressão do RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* em CMSP foram realizados por qPCR, assim como foram realizados para as linhagens celulares HepG2 e Caco-2 e descritos no item 3.1.5.2. No entanto, em CMSP, a análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando-se o gene da ubiquitina C (*UBC*) como referência endógena, de acordo com resultados das análises do programa geNorm (RODRIGUES, 2008; VANDESOMPELE et al., 2002). Para o gene UBC, as sequências dos iniciadores (sense: ATTTGGGTCGCGGTTCTTG; antisense: TGCCTTGACATTCTCGATGGT) foram previamente descritas na literatura (VANDESOMPELE et al., 2002). Por sua vez, a sonda do gene (VIC® TCGTCACTTGACAATGC MGBNFQ) foi selecionada utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, conforme descrito no item 3.1.5.2. Nas reações de amplificação, as condições estabelecidas para o gene UBC foram as mesmas descritas anteriormente para o *HMBS* e o *GAPDH* (item 3.1.5.2).

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

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

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

3.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados através dos softwares Sigma Stat versão 3.5 (Systat Software, Inc., CA, EUA) e Graph Pad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software Inc., CA, EUA).

Em linhagens celulares, cada grupo de experimentos foi realizado no mínimo duas vezes e em duplicata, com células pertencentes a diferentes passagens. Os resultados foram reportados como média±SEM e as diferenças entre as médias dos

tratamentos, em diferentes tempos, foram comparadas com a amostra-controle e analisadas por Two-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Se somente um tempo foi avaliado, o teste de escolha foi o *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ou Tukey.

Nos estudos com humanos, os dados foram apresentados como média $\pm$ SEM ou houve a representação da mediana com ou sem a faixa interquartílica. Nas análises dos polimorfismos genéticos, os genótipos heterozigotos foram agrupados com os genótipos raros, para aumentar o poder estatístico dos testes. Variáveis categóricas foram comparadas por Qui-quadrado (χ^2). Duas variáveis contínuas não-pareadas foram comparadas por teste t de *Student* (paramétrico) ou de *Mann-Whitney* (não-paramétrico). Com esse mesmo número de variáveis, quando a amostra foi pareada, o teste de escolha foi o teste t de Student para amostras pareadas (paramétrico) ou de Wilcoxon (não-paramétrico). Para mais de duas variáveis pareadas, foram utilizados os testes *One-way* ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey (paramétrico) ou o ANOVA de medidas repetidas *on Ranks* de *Friedman* seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* (não-paramétrico).

As correlações foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de *Spearman* (r_s) e, para esse estudo, foram considerados r_s maiores de 0,5. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Efeito dos hipolipemiantes sobre a proliferação, viabilidade e fragmentação de DNA nas linhagens celulares

Os resultados de experimentos de citotoxicidade da sinvastatina em células HepG2 os quais nos permitiram selecionar as concentrações utilizadas nesse estudo estão apresentados no **Apêndice A**.

As concentrações de sinvastatina utilizadas nos experimentos com a linhagem Caco-2 e as de atorvastatina utilizadas nos experimentos com as células HepG2 e Caco-2 foram selecionadas com base em resultados de estudos prévios realizados por nossa equipe (RODRIGUES, 2008; RODRIGUES et al., 2009). Por outro lado, as concentrações de ezetimiba utilizadas nos experimentos com as linhagens HepG2 e Caco-2 foram selecionadas com base em trabalhos já publicados na literatura (DAVIGNON; DUBUC, 2009; YAMANASHI; TAKADA; SUZUKI, 2007).

4.1.2 Expressão de RNAm basal nas linhagens celulares

Inicialmente foram realizados ensaios de qPCR com diferentes concentrações de iniciadores e sondas, no caso dos ensaios nos quais estes dois componentes foram adquiridos separadamente (*UBC*, *GAPDH*, *HMBS*). Após esses testes, foram selecionadas as concentrações que saturavam o sistema. Então, para todos os ensaios, foram analisadas diluições seriadas de cDNA. Os dados do log da concentração de cDNA vérsus C_T para cada ensaio de amplificação originou uma curva-padrão, cujo coeficiente angular da reta (*slope*) foi utilizado para cálculo de eficiência do respectivo ensaio, conforme descrito anteriormente.

As eficiências de amplificação foram de 90,1; 90,4; 94,4; 94,8; 102,1; 103,7; 104,4 e 109,1% para os genes HMBS, SCARBI, NR1H3, ABCG1, GAPDH, ABCA1; NR1H2 e UBC, respectivamente (**Figura 2**).

Figura 2 - Valores de eficiências de amplificação por qPCR para os genes (A) *ABCA1*; (B) *ABCG1*; (C) *SCARB1*; (D) *NR1H2*; (E) *NR1H3*; (F) *UBC*; (G) *GAPDH*; (H) *HMBS*

Nota: A eficiência foi estimada pela análise de regressão linear do gráfico obtido pela relação C_T versus log da concentração de cDNA (ng).

O perfil de expressão basal do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* nas células HepG2 e Caco-2 está apresentado na **Figura 3**.

Nas células HepG2, o *SCARB1* foi o mais expresso. *NR1H2* e *NR1H3* foram, respectivamente, 8 e 5 vezes mais expressos que o *ABCG1* e o *ABCA1* apresentou a menor expressão nessas células.

O *SCARB1* também foi o gene mais expresso em células Caco-2 (**Figura 3**), seguido pelo *ABCA1* que apresentou expressão de RNAm 24 vezes maior que a do *ABCG1*.

Figura 3 - Perfil basal de expressão de RNAm dos genes estudados nas linhagens HepG2 e Caco-2

Nota: RNAm, RNA mensageiro. A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH* (HepG2) ou *HMBS* (Caco-2). Cada símbolo representa o valor médio da duplicata de uma amostra controle (n=13 a 21), calculado com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ e a linha horizontal representa a mediana dos dados. Valores no eixo Y em escala log.

4.1.3 Efeito de hipolipemiantes na expressão de RNAm e proteínas em células HepG2

A atorvastatina não alterou a expressão de RNAm do *ABCA1* e *SCARB1* e causou um aumento da expressão de *ABCG1* em células HepG2 tratadas por 12 e 24 horas, nas concentrações de 1 e 10 μ M (**Figura 4**).

Após 12 horas de tratamento, a transcrição do *ABCG1* foi significativamente aumentada com 1 ($3,59 \pm 0,50$) e 10 μ M de atorvastatina ($3,53 \pm 0,50$) quando comparados ao controle ($1,00 \pm 0,08$, $p < 0,001$). O aumento de expressão do *ABCG1* foi observado também após tratamento de 24 horas com 1 ($3,15 \pm 0,46$ vérsus $1,00 \pm 0,15$, $p < 0,001$) e 10 μ M ($4,95 \pm 0,68$ vérsus $1,00 \pm 0,15$, $p < 0,001$) (**Figura 4**).

Para verificarmos se o efeito sobre a expressão de RNAm desses genes é classe dependente, nós também avaliamos a influência de outro fármaco desta classe, a sinvastatina.

O tratamento das células HepG2 com sinvastatina (0,01 a 10 μ M) por 6, 12 ou 24, assim como o tratamento com atorvastatina, não alterou a expressão dos genes ABCA1 e SCARB1 (**Figura 4**). Já os valores de expressão de RNAm do gene ABCG1 foram 2 vezes aumentados após 24 horas de tratamento com 1 ($2,11 \pm 0,24$ vérsus $1,00 \pm 0,11$, $p < 0,001$) e 10 μ M ($2,28 \pm 0,19$ vérsus $1,00 \pm 0,11$, $p < 0,001$). Estes resultados indicam que o efeito do tratamento com estatina sobre a expressão dos genes estudados parece não depender de uma estatina específica.

Em seguida, nós investigamos se o efeito do tratamento com estatina na expressão de RNAm do *ABCG1* poderia ser decorrente da falta de algum intermediário da síntese *de novo* do colesterol. Para isso, as células HepG2 foram tratadas com atorvastatina 20 μ M, por 24 horas, na presença ou ausência de ácido mevalônico lactona 0,2 mM. O tratamento com ácido mevalônico lactona reverteu o aumento da transcrição do gene causado pelo tratamento com atorvastatina 20 μ M (**Figura 5**). Assim, podemos inferir que a regulação do gene *ABCG1* está relacionada à inibição da HMGCoA redutase pelas estatinas.

Figura 4 - Efeito do tratamento com atorvastatina e sinvastatina na expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em células HepG2

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

Figura 5 - Efeito da atorvastatina e do ácido mevalônico lactona na expressão de RNAm do *ABCG1* em células HepG2

Nota: Valores (média±SEM, n=3) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. * $p < 0,001$ quando comparado com controle (0 µM) como indicado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Holm-Sidak.

Nós também avaliamos se o tratamento com atorvastatina (0 a 10 µM) influencia a expressão de RNAm dos genes *NR1H2* e *NR1H3*, uma vez que as proteínas codificadas por estes genes são fatores de transcrição envolvidos com a regulação do metabolismo do colesterol.

Conforme visualizado na **Figura 6**, após 12 e 24 horas de tratamento com altas doses de atorvastatina (10 µM), houve aumento na transcrição do *NR1H2* ($2,21 \pm 0,44$ versus $1,00 \pm 0,13$, $p < 0,001$ e $2,52 \pm 0,21$ versus $1,00 \pm 0,16$, $p < 0,001$, respectivamente) e do *NR1H3* ($3,78 \pm 0,41$ versus $1,00 \pm 0,08$, $p < 0,001$ e $2,26 \pm 0,40$ versus $1,00 \pm 0,21$, $p < 0,05$, respectivamente).

Da mesma forma, o tratamento de células HepG2 com a ezetimiba 5,0 µM por 24 horas resultou em um modesto aumento (1,3 vezes) na transcrição de *ABCG1* ($p < 0,05$) sem alteração na expressão de RNAm do *ABCA1* e do *SCARB1* (**Figura 7**). Por outro lado, a ezetimiba causou redução na transcrição de *NR1H2*, mas não de *NR1H3*. Essa redução de expressão de RNAm do *NR1H2* foi significativa após 12 horas de tratamento com 5,0 µM ($0,71 \pm 0,02$) e também após 24 horas com 1,0 ($0,80 \pm 0,07$), 2,5 ($0,74 \pm 0,04$) e 5,0 µM de ezetimiba ($0,75 \pm 0,03$), comparada com o controle (12 h: $1,00 \pm 0,03$; 24 h: $1,00 \pm 0,11$, $p < 0,05$) (**Figura 7**).

Análises de correlações entre os genes *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* não revelaram nenhuma correlação significativa entre eles (dados não apresentados).

Figura 6 - Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão de RNAm do *NR1H2* e *NR1H3* em células HepG2

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

Figura 7 - Efeito do tratamento com ezetimiba na expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* em células HepG2

Nota: qPCR dos genes foi realizada a partir de RNA total extraído das células HepG2 tratadas com ezetimiba (0,5 a 5 μM) e controle (0 μM). Valores (média±SEM, n =3) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. * p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado com controle (0 μM) como indicado por Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

Como as estatinas causaram um aumento da expressão de RNAm do *ABCG1* em células HepG2 após 12 e 24 horas de tratamento, nós investigamos o efeito delas sobre a expressão de proteína ABCG1 nessas células. Conforme mostrado na

Figura 8, a expressão da proteína ABCG1 em HepG2 não foi significativamente alterada após tratamento com atorvastatina ou sinvastatina por 24 horas.

Figura 8 - Expressão da proteína ABCG1 em células HepG2 tratadas com estatinas

Nota: Western blotting foi realizado com proteínas totais extraídas de células HepG2 tratadas com atorvastatina (A) ou sinvastatina (B) nas concentrações de 0 a 10 µM por 24 horas. A análise densitométrica das bandas de proteínas, normalizadas pela quantidade de B-actina, foi realizada com a utilização do software Image J. Os valores representam média±SEM, n=4.

4.1.4 Efeito de hipolipemiantes na expressão de RNAm em células Caco-2

O tratamento com atorvastatina ou sinvastatina, nas concentrações de 0,01 a 1 µM, por 12 ou 24 horas, não alterou a expressão de RNAm do *SCARB1* em células Caco-2 (**Figura 9**). A expressão do *ABCG1* também não foi alterada após tratamento com as estatinas, embora se tenha observado uma tendência à redução da sua transcrição após tratamento com sinvastatina ($p=0,07$) (**Figura 9**).

Por outro lado, os valores de expressão de RNAm do gene *ABCA1* foram reduzidos após 12 e 24 horas de tratamento com atorvastatina em 0,1 (12 h: $0,55\pm0,06$ versus $1,00\pm0,02$, $p<0,01$; 24 h: $0,64\pm0,08$ versus $1,00\pm0,01$, $p<0,05$) e 1 µM (12 h: $0,58\pm0,04$ versus $1,00\pm0,02$, $p<0,01$; 24 h: $0,58\pm0,10$ versus $1,00\pm0,01$, $p<0,05$) (**Figura 9**).

Da mesma forma, a redução da transcrição do *ABCA1* foi observada após os tratamentos com sinvastatina com 0,01 (12 h: $0,59\pm0,02$; 24 h: $0,62\pm0,04$); 0,1 (12 h: $0,50\pm0,01$; 24 h: $0,59\pm0,14$) e 1 µM (12 h: $0,54\pm0,06$; 24 h: $0,55\pm0,15$) quando comparados ao controle (12 h: $1,00\pm0,11$; 24 h: $1,00\pm0,15$, $p<0,05$) (**Figura 9**).

Figura 9 - Efeito do tratamento com estatinas na expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em células Caco-2

Nota: qPCR dos genes foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com atorvastatina ou simvastatina (0,01 a 1 μM) e controle (0 μM) por 12 e 24 horas. Valores (média±SEM, n=3) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com controle (0 μM) como indicado por Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

No intuito de verificar se o efeito sobre a expressão do *ABCA1*, do *ABCG1* e do *SCARB1* eram reproduzidos em experimentos com outros hipolipemiantes, nós também avaliamos o efeito da ezetimiba (0,5 a 5 μM) sobre a expressão de RNAm dos genes em células Caco-2 tratadas por 12 ou 24 horas. Conforme demonstrado na **Figura 10**, esse tratamento não alterou a expressão de nenhum dos transcritos analisados.

Quando avaliamos a associação das duas classes de medicamentos, o tratamento com ezetimiba (2,5 ou 5 μM) e sinvastatina (1 μM) por 24 horas diminuiu a expressão de *ABCA1* e não alterou a de *SCARB1* (**Figura 11**). Além disso, esse tratamento também diminuiu a transcrição de *ABCG1* (**Figura 11**), efeito que se havia manifestado como uma tendência após o tratamento com sinvastatina isolada.

Figura 10 - Efeito do tratamento com ezetimiba na expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em células Caco-2

Nota: qPCR dos genes foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com ezetimiba (0,5 a 5 μM) e controle (0 μM) por 12 e 24 horas. Valores (média $\pm$ SEM, n=4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Figura 11 - Efeito do tratamento com ezetimiba e sinvastatina na expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em células Caco-2

Nota: qPCR dos genes foi realizado a partir de RNA total extraído das células Caco-2 tratadas com ezetimiba (2,5 e 5 μM) em combinação com sinvastatina (1 μM) e controle (0 μM) por 24 horas. Valores (média $\pm$ SEM, n=3 ou 4) calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. * $p < 0,05$ quando comparado com controle (0 μM) como indicado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Dados basais dos pacientes e resposta aos tratamentos farmacológicos

De todos os indivíduos selecionados (71HC e 50NL), 52% declararam não estar tomando qualquer tipo de medicamento desde o momento da triagem; nenhum deles estava sob tratamento com hipocolesterolemiantes. Na **Tabela 2** são apresentados os dados dos indivíduos incluídos no estudo. As médias de idade, de pressão sanguínea sistólica e diastólica e de índice de massa corpórea (IMC) foram maiores em pacientes HC quando comparados aos NL ($p<0,05$). Indivíduos HC, quando comparado aos NL, também apresentaram maiores proporções de mulheres em menopausa ou de histórico de doença arterial coronariana (DAC) ($p<0,05$). Por outro lado, as distribuições de gênero, proporções de fumantes e a prática de exercício físico foram similares entre os grupos ($p>0,05$). É importante mencionar que, para esse estudo, foram considerados fumantes indivíduos que fumam ou que pararam de fumar há menos de 4 anos; como atividade física foi considerada a prática de exercício aeróbico por, no mínimo, duas horas por semana e como histórico de DAC foi considerada a história familiar prévia de infarto agudo do miocárdio ou angina.

Ainda com relação aos resultados apresentados na **Tabela 2**, como esperado, indivíduos HC apresentaram concentrações séricas de lipídeos superiores às dos indivíduos NL ($p<0,001$), com exceção dos valores de HDL-C e apo AI que foram similares entre os grupos.

Tabela 2 – Características clínicas, variáveis antropométricas e perfil lipídico sérico basal dos indivíduos estudados

Variável	NL (50)	HC (71)	<i>p</i>
Idade (anos)	45±1	54±1	<0,001
Pressão sanguínea sistólica (mmHg)	114±2	127±2	<0,001
Pressão sanguínea diastólica (mmHg)	70±1	80±2	<0,001
IMC (kg/m ²)	25±0,4	26±0,3	0,007*
Gênero (Masculino/Feminino)(%)	24/76	35/65	0,264
Mulheres na menopausa (%)	26	70	<0,001
Fumante (%)	24	22	0,975
Prática de atividade física (%)	42	49	0,544
Histórico de DAC (%)	34	56	0,025
Perfil lipídico basal			
CT (mg/dL)	175±2	271±3	<0,001
TG (mg/dL)	74±4	143±7	<0,001
HDL-C (mg/dL)	58±2	60±2	0,687
LDL-C (mg/dL)	101±2	182±3	<0,001*
Apo AI (mg/dL)	144±4	147±3	0,847
Apo B (mg/dL)	89±3	135±4	<0,001

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como média±SEM e foram comparadas por Teste t de Student* ou Teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2). Apo AI, apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; DAC, doença arterial coronariana; HC, indivíduos hipercolesterolêmicos; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC, índice de massa corpórea; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, indivíduos normolipidêmicos; TG, triglicerídeos.

A eficácia dos tratamentos com atorvastatina e com sinvastatina e/ou ezetimiba foi observada pela redução dos valores dos lipídeos plasmáticos, conforme **Figura 12** e **Tabela 3**.

Houve redução significativa ($p<0,05$) das concentrações séricas de colesterol total, LDL-C, triglicerídeos, apo B e inclusive do HDL-C após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas) (**Figura 12**). Após a terapia com ezetimiba (10 mg/dia/4 semanas), sinvastatina (10 mg/dia/8 semanas) e com a combinação dos dois fármacos (10 mg de cada/dia/4 semanas), também houve redução gradativa desses parâmetros, com exceção dos valores séricos de HDL-C, que não

variaram, e de triglicerídeos, os quais foram reduzidos após tratamento com sinvastatina e sinvastatina associada com ezetimiba ($p<0,05$), porém não após o tratamento com ezetimiba isolada (**Tabela 3**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de apo AI com os tratamentos ($p>0,05$).

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e creatino quinase (CK) séricas não variaram com as terapias farmacológicas ($p>0,05$, dados não mostrados) sugerindo, portanto, que nas doses utilizadas e durante os períodos de estudo, o ezetimiba e as estatinas não promoveram hepatotoxicidade ou miotoxicidade.

Figura 12 - Parâmetros bioquímicos séricos dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4semanas)

Nota: Valores são apresentados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ dos dados ($n=48$). * $p=0,001$ e ** $p<0,001$ calculados pelos testes t de Student ou de Wilcoxon, ambos para amostras pareadas. Apo AI, apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com ezetimiba e sinvastatina

Variável (mg/dL)	Basal	Eze	Sinva	Eze+Sinva	<i>p</i>
CT	271±5	226±7	207±7	178±7	<0,001*
LDL-C	181±5	137±5	122±6	93±6	<0,001*
HDL-C	60±2	62±2	60±3	60±3	0,093**
TG	146±12	136±13	123±11	123±12	0,009* [#]
Apo AI	147±5	147±5	147±6	152±5	0,643**
Apo B	120±4	97±4	88±4	74±5	<0,001*

Nota: Valores são apresentados como média±SEM dos dados (n=23) e comparados por: (*) One-way ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey ou (**) ANOVA de medidas repetidas *on Ranks* de *Friedman*. [#]Os valores de triglicerídeos foram significativamente reduzidos somente quando comparados os valores basais com aqueles após tratamento com sinvastatina isolada ou com a terapia combinada. Apo AI, apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; Eze, ezetimiba; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; Sinva, sinvastatina; TG, triglicerídeos.

4.2.2 Expressão de RNAm basal em CMSP

O perfil de expressão gênica foi avaliado nas CMSP dos indivíduos pertencentes aos grupos NL (n=50) e HC (n=71), sendo a ordem de expressão dos genes, nos dois grupos, a seguinte (**Figura 13**):

$$NR1H2=ABCG1>>>SCARB1=ABCA1>>NR1H3$$

Entre indivíduos NL e HC, as expressões de RNAm basais dos genes ABCA1, SCARB1 e ABCG1 foram similares, embora para o *ABCG1* tenha havido uma tendência de maior expressão em HC ($p=0,067$). Por outro lado, foi significativa a maior transcrição de *NR1H2* e *NR1H3* em indivíduos HC, quando comparados aos NL ($p<0,05$).

Figura 13 - Perfil de expressão de RNAm basal dos genes estudados em CMSP

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Cada símbolo representa o valor médio da duplicata de uma amostra, calculado com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ e a linha horizontal representa a mediana dos dados. Valores no eixo Y em escala log. Valores de p calculados com o teste de Mann-Whitney. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC, Indivíduos hipercolesterolêmicos, n=71; NL, indivíduos normolipidêmicos, n=50; RNAm, RNA mensageiro.

A análise de correlação entre a expressão basal de RNAm em CMSP de indivíduos normo e hipercolesterolêmicos revelou uma correlação positiva entre os genes *ABCA1* e *ABCG1* (**Figuras 14 e 15**). Correlações entre a expressão de *SCARB1* e *ABCA1* ou *ABCG1* foram encontradas somente em normolipidêmicos (**Figura 14**); por outro lado, *NR1H2* e *NR1H3* foram positiva e significativamente correlacionados entre si mas não com os outros genes estudados somente nos indivíduos HC (**Figura 15**).

Cabe observar que os coeficientes de correlação de *Spearman* entre o *ABCA1* e *ABCG1* foram mais fortes tanto em normocolesterolêmicos ($r_s=0,790$; **Figura 14**) quanto em hipercolesterolêmicos ($r_s=0,841$; **Figura 15**) ($p<0,001$).

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a expressão gênica e o perfil lipídico sérico (dados não mostrados). É importante ressaltar que, neste estudo, foram somente considerados valores de coeficientes de correlação maiores ou iguais a 0,5.

Figura 14 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes ABCA1 e ABCG1 (A), ABCA1 e SCARB1 (B) e ABCG1 e SCARB1 (C) em CMSP de indivíduos normolipídêmicos

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ ($n=50$). Valores de p calculados pelo teste de Correlação de *Spearman*. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; r_s , Coeficiente de correlação de *Spearman*; RNAm, RNA mensageiro.

Figura 15 - Correlação entre a expressão de RNAm basal dos genes ABCA1 e ABCG1 (A), e NR1H2 e NR1H3 (B) em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ ($n=71$). Valores de p calculados pelo teste de Correlação de *Spearman*. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; r_s , Coeficiente de correlação de *Spearman*; RNAm, RNA mensageiro.

4.2.3 Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de RNAm em CMSP

O tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas) reduziu em 21% a média de expressão do RNAm do *ABCA1* e em 24% do *ABCG1* ($p<0,05$) (**Figura 16**). Para o *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* não houve alteração da expressão gênica após o tratamento farmacológico ($p>0,05$) (**Figura 16**).

Figura 16 - Efeito do tratamento com atorvastatina na expressão do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. A linha horizontal representa a mediana dos dados (n=48). Valores no eixo Y em escala log e valores de p calculados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; Basal ou Atorva, indivíduos hipercolesterolêmicos antes ou após o tratamento com atorvastatina; RNAm, RNA mensageiro.

Para verificar se os efeitos observados sobre a transcrição dos genes é dependente da estatina ou da classe de hipolipemiantes utilizada no tratamento, nós também avaliamos o efeito do tratamento com ezetimiba (10mg/dia/4 semanas), sinvastatina (10mg/dia/8 semanas) e ezetimiba com sinvastatina (10mg/dia/4 semanas) sobre a expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3*.

Como o tratamento com atorvastatina, também o tratamento com sinvastatina e ezetimiba, isoladas ou não, reduziu a expressão do *ABCA1* e do *ABCG1* ($p<0,05$) e não modificou a expressão dos outros genes avaliados (**Figura 17**).

Comparados aos valores basais, houve redução de transcrição do *ABCA1* em cerca de 28% após o tratamento com ezetimiba ou sinvastatina e 39% após o tratamento combinado ($p<0,05$). De forma semelhante, a ezetimiba reduziu em 33% a expressão do *ABCG1*, a sinvastatina 28% e os dois fármacos juntos reduziram em 39% ($p<0,05$).

Embora não tenha sido indicado na figura, é importante comentar que a terapia combinada reduziu significativamente a expressão dos dois genes (*ABCA1* e *ABCG1*) quando comparada ao tratamento com ezetimiba. Além

disso, a terapia combinada comparada ao tratamento com sinvastatina isolada também reduziu a transcrição do *ABCG1*.

Figura 17 - Expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos (n=23), antes e após o tratamento com ezetimiba e sinvastatina

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. A linha horizontal representa a mediana dos dados (n=23). Valores no eixo Y em escala log. $p < 0,05$ com relação ao tempo basal, após teste ANOVA de medidas repetidas *on Ranks* de *Friedman* seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls*. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; Eze, ezetimiba; Sinva, sinvastatina; RNAm, RNA mensageiro.

As análises de correlação de *Spearman* entre a expressão de RNAm dos genes em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos após o tratamento com atorvastatina, sinvastatina e/ou ezetimiba podem ser observadas nas **Figuras 18 e 19**. De um modo geral, o perfil de correlação se manteve igual ao observado antes do tratamento (**Figura 15** anterior), com exceção das correlações entre os genes ABCA1 ou ABCG1 e SCARB1 que foram significativas somente após o tratamento com atorvastatina ($r_s > 0,5$ e $p < 0,05$).

Foram também analisadas as correlações entre as expressões de RNAm dos genes com as do perfil lipídico sérico de indivíduos HC após a terapia com hipolipemiantes mas não foi encontrado nenhum resultado significativo (dados não mostrados).

Figura 18 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes ABCA1 e ABCG1 (A), ABCA1 e SCARB1 (B), ABCG1 e SCARB1 (C) e NR1H2 e NR1H3 (D) em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos após o tratamento com atorvastatina

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ ($n=48$). Valores de p calculados pelo teste de correlação de *Spearman*. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; r_s , coeficiente de correlação de *Spearman*; RNAm, RNA mensageiro.

Figura 19 - Correlação entre a expressão de RNAm dos genes ABCA1 e ABCG1 e NR1H2 e NR1H3 em CMSP de indivíduos hipercolesterolêmicos após o tratamento com ezetimiba e sinvastatina

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$ ($n=23$). Valores de p calculados pelo teste de correlação de *Spearman*. CMSP, células mononucleares do sangue periférico; Eze, ezetimiba; Sinva, sinvastatina; r_s , Correlação de *Spearman*; RNAm, RNA mensageiro.

4.2.4 Associação entre expressão de RNAm e polimorfismos C-14T e R219K do *ABCA1*

A relação entre os polimorfismos C-14T e R219K sobre a expressão gênica do *ABCA1* em CMSP foi pesquisada neste estudo. As frequências dos alelos -14T e 219K e suas influências no perfil lipídico destes indivíduos já foram publicadas pelo nosso grupo (GENVIGIR et al., 2008).

Análises comparativas entre os grupos NL e HC não revelaram alteração na transcrição do *ABCA1* associada com a presença dos polimorfismos estudados ($p>0,05$, dados não mostrados). Em indivíduos NL não houve associação entre a expressão basal de RNAm do *ABCA1* e o polimorfismo C-14T (**Figura 20**). No entanto, em indivíduos HC, observou-se maior expressão gênica basal em portadores do alelo raro -14T (genótipos CT+TT) quando comparados aos indivíduos portadores do genótipo -14CC ($p=0,034$). Porém, esta diferença de expressão de RNAm entre os diferentes genótipos desapareceu após o tratamento com atorvastatina ($p=0,926$) (**Figura 20**).

Para o polimorfismo R219K, nenhuma diferença de expressão do *ABCA1* foi observada em indivíduos NL ou HC (**Figura 21**). Embora não destacado nas figuras, após o tratamento com a atorvastatina, a diminuição da expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP foi independente dos polimorfismos analisados ($p < 0,05$).

Figura 20 - Efeito do polimorfismo C-14T do *ABCA1* sobre a expressão gênica em CMSP de indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos antes (Basal) e após o tratamento com atorvastatina (Atorva)

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log e valores de p calculados com o teste de Mann-Whitney. Os *Box plots* indicam a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos, percentis 10 e 90). CMSP, células mononucleares do sangue periférico; RNAm, RNA mensageiro.

Figura 21 - Efeito do polimorfismo R219K do *ABCA1* sobre a expressão gênica em CMSP de indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos antes (Basal) e após o tratamento com atorvastatina (Atorva)

Nota: A expressão de RNAm de cada gene foi medida por qPCR e normalizada com o controle endógeno *UBC*. Valores calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores no eixo Y em escala log e valores de p calculados com o teste de Mann-Whitney. Os *Box plots* indicam a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos, percentis 10 e 90). CMSP, células mononucleares do sangue periférico; RNAm, RNA mensageiro.

5 DISCUSSÃO

A relação inversa entre o HDL-C sérico e o risco de eventos cardiovasculares já é bem conhecida. O aumento de 1mg/dL nos valores de HDL-C pode ser associado com diminuição de 2% no risco de DAC em homens e 3% em mulheres (GORDON et al., 1989). Segundo Asztalos (2004), a heterogeneidade de respostas observadas em monoterapias com estatinas, com relação ao HDL-C sérico, pode ser uma possível explicação para o fato de alguns pacientes em tratamento com estatinas terem eventos coronarianos, apesar da redução nas concentrações de LDL-C. Por isso, entender como os hipolipemiantes podem influenciar a expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol (TRC) é de grande interesse.

O presente estudo avaliou o efeito de medicamentos hipolipemiantes (estatinas e ezetimiba) na expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1, do receptor SRBI (*SCARB1*), e dos fatores de transcrição LXR- α (*NR1H3*) e LXR- β (*NR1H2*), os quais estão envolvidos no metabolismo da HDL (OOSTERVEER et al., 2010; VAN DER VELDE, 2010). Os estudos foram realizados tanto *in vitro*, utilizando-se as linhagens celulares HepG2 e Caco-2, como *in vivo*, com CMSP de indivíduos NL e HC tratados com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas), sinvastatina (10 mg/dia/8 semanas), ezetimiba (10 mg/dia/4 semanas) ou com a combinação de sinvastatina e ezetimiba.

O perfil de expressão gênica nas linhagens celulares diferiu do observado em CMSP. Nas linhagens Caco-2 e HepG2, o *SCARB1* foi o gene mais expresso, seguido pelo *ABCA1* na Caco-2 ou, na HepG2, pelos genes *NR1H2* e *NR1H3*, os quais foram, respectivamente, 8 e 5 vezes mais expresso que o *ABCG1*, ao passo que o *ABCA1* apresentou a menor expressão nesta linhagem hepática. Nas CMSP o *ABCG1* e o *NR1H2* foram mais expressos do que o *ABCA1* e o *SCARB1*, os quais não diferiram entre si e foram mais expressos que o *NR1H3*.

Parcialmente concordante com nossos achados, em monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis ou com diabetes melito, a expressão do *ABCG1* foi a maior, seguida pela do *ABCA1* e do *SCARB1*, em menor grau (LI; XU; GU, 2009; ZHOU et al., 2008). Ao contrário dos nossos achados, em CMSP de doadores saudáveis, o *NR1H2* foi menos expresso que o *NR1H3* (DIBLASIO-SMITH et al.,

2008). Esta diferença pode ser devida ao *status* do colesterol sanguíneo dos indivíduos estudados. O gene de referência usado nos ensaios de qPCR também pode ter contribuído para os diferentes resultados. Enquanto o *GAPDH* foi usado no estudo de DiBlasio-Smith e colaboradores (2008), nós selecionamos o gene *UBC* como o gene mais estável para as nossas condições experimentais. Já foram reportados na literatura trabalhos com resultados diferentes em razão da escolha do gene de referência usado (HUGGETT et al., 2005). Por isso, a validação dos ensaios de estabilidade e expressão para o gene constitutivamente expresso em diferentes condições experimentais é muito importante (VANDESOMPELE et al., 2002).

Concordante com nosso achado em células Caco-2, o *ABCA1* foi mais expresso que o *ABCG1* em enterócitos de *hamsters* (FIELD; BORN; MATHUR, 2004) e, considerando-se que a HepG2 é uma linhagem derivada de carcinoma hepatocelular, a grande diferença de expressão basal entre *ABCG1* e *ABCA1* observada nestas células (384 vezes), comparada às CMSP (2 vezes), está de acordo com o descrito por Moustafa e colaboradores (2004). Os autores demonstraram que, em tecido hepático de pacientes portadores de carcinoma hepatocelular, a expressão de *ABCA1* foi menor e a de *ABCG1* foi maior, em região de tecido tumoral, quando comparada com a região não-tumoral (MOUSTAFA et al., 2004).

Nós avaliamos a expressão do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em células HepG2 e Caco-2 tratadas com diferentes concentrações de atorvastatina cálcica (0-10 μ M), sinvastatina ácida (0-10 μ M) ou ezetimiba (0-5 μ M) por até 24 horas. As concentrações e tempos escolhidos não causaram nenhum efeito tóxico para as células. Nossos resultados mostraram que o efeito das estatinas sobre a expressão dos genes, avaliados nesse estudo, é independente do tipo de estatina utilizada no tratamento, o que demonstra um efeito decorrente da inibição da HMGCoA redutase. Além disso, diferentemente dos estudos com CMSP (discussão adiante), os hipolipemiantes estudados causaram diferentes respostas sobre a expressão dos genes *ABCA1* e *ABCG1* e suas transcrições não foram correlacionadas (dados não mostrados).

Na linhagem celular HepG2, as estatinas e a ezetimiba não alteraram a expressão do gene *ABCA1* e o mesmo efeito foi observado em células Caco-2 tratadas com ezetimiba isolada. No entanto, as estatinas e o tratamento combinado

(sinvastatina e ezetimiba) reduziram a expressão de RNAm do *ABCA1* em células Caco-2.

Assim como nós, outros autores não constatarem alterações de expressão de RNAm e, além disso, de proteína *ABCA1* em células HepG2 e em tecido hepático de camundongos tratados com pravastatina (ANDO et al., 2004). O tratamento com fluvastatina (20mg/dia) ou atorvastatina (80mg/dia), por quatro semanas antes da cirurgia, também não modificou a expressão hepática de *ABCA1*, em indivíduos normocolesterolêmicos portadores de cálculo biliar (PARINI et al.; 2008).

Tamehiro e colaboradores (2007), além de relatarem a invariabilidade da expressão de RNAm e de proteína *ABCA1* em células de hepatoma de ratos (McARH7777) tratadas com compactina, também observaram que o tratamento com compactina diminuiu a transcrição de *ABCA1* em linhagem celular de fibroblastos (Rat2) e que o tratamento com pravastatina e colestimide (uma resina sequestrante de ácido biliar) diminuiu a expressão de *ABCA1* em tecido intestinal de ratos. Segundo os autores, existem diferentes transcritos do *ABCA1* e eles são diferentemente expressos nos diversos tecidos, o que faz com que as células periféricas (fibroblastos) ou intestinais tenham diminuição da expressão do *ABCA1*, enquanto as células hepáticas permanecem com a quantidade constante do transcrito após o tratamento com estatinas. Esta invariabilidade em tecido hepático é resultado de dois eventos distintos, a saber:

(1) Diminuição de um transcrito do *ABCA1* que é regulado por LXRE: a diminuição de oxisteróis ligantes de LXR resulta na diminuição da taxa de ativação do gene. Além de estar presente nas células hepáticas, este transcrito é o único presente em células intestinais e é o dominante em fibroblastos;

(2) Aumento de outro transcrito responsivo ao SREBP-2, um fator de transcrição que é clivado a uma forma ativa em resposta à depleção de colesterol celular (induzida pela compactina, neste caso) (GOLDSTEIN; DEBOSE-BOYD; BROWN, 2006) e se liga aos elementos responsivos a esteróis presentes no *ABCA1*, ativando o gene.

Ainda segundo Tamehiro e colaboradores (2007), estes dois tipos de transcritos foram predominantes em tecido hepático humano. Nossos achados foram concordantes com os desses autores, uma vez que houve invariabilidade da expressão de *ABCA1* em HepG2 e diminuição em Caco-2, após tratamento com atorvastatina e sinvastatina.

Ando e colaboradores (2004) também sugeriram em seu trabalho a existência de um equilíbrio na taxa de expressão de *ABCA1* em tecido hepático. Segundo os autores o aumento da expressão do LXR α pela pravastatina poderia compensar a supressão da sua atividade. Os autores verificaram um aumento na expressão de RNAm do gene codificante de LXR α em tecido hepático de camundongos tratados com pravastatina por 24 horas ou 2 semanas, mas não em HepG2 tratada com o fármaco por 8 horas (10 μ M). Nós verificamos que o aumento na expressão de RNAm dos genes NR1H3 e NR1H2 em células HepG2 só foi evidenciado após 12 ou 24 horas de tratamento com 10 μ M de atorvastatina. No entanto, esta hipótese dos autores precisa ser mais bem avaliada, uma vez que o aumento da transcrição não significa necessariamente um aumento da tradução desses fatores de transcrição e, além disso, não é o fator de transcrição em si, mas sim ele ativado por oxisteróis que tem o potencial de afetar a transcrição gênica. Isso parece ser evidente, visto que nós observamos, neste trabalho, que não houve correlação significativa entre as expressões de RNAm dos LXRs e *ABCA1*, *ABCG1* ou *SCARB1*.

Ao contrário, outros autores observaram que, em células HepG2 e em células Fu5AH (hepatoma de ratos), a pitavastatina e a fluvastatina aumentaram a expressão de RNAm do *ABCA1* ou melhoraram o efluxo de lipídeos mediado pela *ABCA1* (MAEJIMA et al., 2004; SONE et al., 2004; ZANOTTI et al., 2004). Maejima e colaboradores (2004) sugeriram que o aumento de expressão do *ABCA1* resulta do efeito combinado da redução de geranilgeranilpirofosfato (intermediário da via do mevalonato e antagonista do LXR) e da supressão da atividade do LXR, que eles acreditam ser temporária, pois a inibição da HMGCoA levaria a um aumento de expressão de LDL com consequente captação de LDL e restauração do colesterol intracelular e da ativação de LXR. Cabe acrescentar que Sone e colaboradores (2004) analisaram a expressão de RNAm em HepG2 por *Northern blotting*, um método menos sensível que o qPCR em tempo real.

Com relação ao tratamento com ezetimiba, consistente com nossos resultados, a expressão de *Abca1* em tecido hepático de camundongos alimentados com dietas que contêm diferentes conteúdos de colesterol (0,02 a 1,00% m/m) não foi afetada pelo tratamento com um análogo do ezetimiba (REPA; DIETSCHY; TURLEY, 2002). Já, em tecido intestinal, Field, Watt e Mathur (2008) demonstraram que, em células Caco-2 diferenciadas, o efluxo de colesterol mediado pela *ABCA1* foi independente da função normal do transportador NPC1L1 e, assim como nós,

demonstraram que a ezetimiba não alterou a transcrição de *ABCA1*. Além disso, nessas mesmas células diferenciadas, outros autores observaram que, após supressão do gene *NPC1L1*, a expressão de *ABCA1* não foi alterada (SANÉ et al., 2006). No entanto, outro trabalho relatou uma diminuição de expressão do *ABCA1* em células Caco-2 tratadas com ezetimiba (DURING; DAWSON; HARRISON, 2005) e há algumas possíveis explicações para os diferentes achados. Primeiro, os autores realizaram os experimentos com o comprimido macerado, enquanto nós utilizamos o princípio ativo puro; segundo, não está claro, mas parece que os autores trataram as células com 24 μ M de ezetimiba, concentração quase 5 vezes maior do que a utilizada por nós; terceiro, ao contrário de nós, o trabalho foi realizado com células Caco-2 diferenciadas e, finalmente, durante os experimentos com ezetimiba, os autores mantiveram as culturas celulares em meio DMEM livre de soro fetal bovino, enquanto nós utilizamos este componente a 10%. Esta última hipótese concorda com estudos prévios mostrando que o tratamento com o SCH 58053, um análogo da ezetimiba, não alterou a expressão de *Abca1* da mucosa jejunal de camundongos alimentados com dieta rica em colesterol (1,0 % m/m), no entanto, causou uma diminuição da expressão do gene quando a quantidade de colesterol da dieta foi menor (0,02 % m/m) (REPA; DIETSCHY; TURLEY, 2002). É importante enfatizar aqui que a concentração máxima de ezetimiba utilizada em nossos estudos, não obstante menor do que a utilizada por outros autores, foi uma condição estabelecida pela companhia farmacêutica que gentilmente forneceu o princípio ativo (Merck/Schering-Plough., NJ, EUA).

Há ainda uma outra possível explicação para as diferenças entre nossos resultados e os de During, Dawson e Harrison (2005): o gene de referência endógena utilizado nos experimentos de qPCR. Em nossos experimentos, avaliamos e selecionamos o *HMBS* como um gene estável para os experimentos com as células Caco-2, conforme descrito anteriormente. No entanto, During, Dawson e Harrison (2005) observaram uma tendência à diminuição da expressão deste gene (aproximadamente 54%) nas células Caco-2 tratadas com ezetimiba.

Análises realizadas por *Northern blotting* revelaram que a expressão de RNAm do *SCARB1* em enterócitos humanos e em células Caco-2 diferenciadas são comparáveis à de fígado humano (HAUSER et al., 1998), mostrando então que a linhagem Caco-2 pode ser um bom modelo para estudo desse gene. Tanto as

estatinas quanto a ezetimiba não alteraram a expressão do gene *SCARB1* nas linhagens celulares analisadas.

As estatinas e a ezetimiba induziram a expressão do *ABCG1* em HepG2, mas não em Caco-2, onde houve, inclusive, uma tendência à redução da expressão de RNAm após tratamento com a sinvastatina, efeito que se tornou significativo após o tratamento combinado com ezetimiba. O aumento de expressão do RNAm do *ABCG1* em HepG2 foi observado após tratamento de 12 ou 24 horas com 1 e 10 μ M de atorvastatina e, também, após 24 horas de tratamento com 1 e 10 μ M de sinvastatina. No entanto, a expressão da proteína ABCG1 em HepG2 não foi significativamente alterada após tratamento com estatinas por 24 horas. Essas diferenças podem ser devidas à utilização de métodos com diferentes sensibilidades para a detecção de RNAm e proteínas. Sabe-se que a qPCR em tempo real para análise de expressão gênica é um método mais sensível do que o *Western blotting* para detecção de proteínas. Outro aspecto importante é que o efeito sobre o RNAm pode não refletir alterações de síntese proteica. Isso pode ocorrer devido ao tempo de tratamento, podendo ser que, para as proteínas, haveria necessidade de avaliar tempos mais longos. Ou, então, alterações em fatores de regulação de síntese proteica podem levar a um desequilíbrio entre a transcrição gênica e a tradução em proteínas. Esse assunto precisa ser mais bem investigado no futuro.

Na literatura, há uma escassez de trabalhos que avaliam os efeitos dos hipolipemiantes sobre a expressão dos genes *ABCG1* e *SCARB1* de tecido hepático ou intestinal. Em cães, espécie sem atividade da CETP, o tratamento com atorvastatina também não alterou a expressão proteica de SRBI no fígado (BRIAND et al., 2006) e o aumento do efluxo mediado pelo SRBI em células de hepatoma Fu5AH tratadas com sinvastatina foi relatado por Franceschini e colaboradores (2007). Em três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) de *hamsters* tratados com lovastatina e colestiramina (também sequestrante de ácido biliar), quando comparados com os animais-controles, houve redução da expressão de *ABCG1* (FIELD; BORN; MATHUR, 2004). Em células Caco-2, During, Dawson e Harrison (2005) relataram diminuição da expressão de RNAm do *SCARB1* após tratamento com ezetimiba; no entanto, como citado acima, discrepâncias com os nossos experimentos podem explicar os diferentes resultados.

Ainda que alguns trabalhos refiram serem lipídeos naturais ou sintéticos os moduladores transcricionais de maior efetividade nos genes ABCA1 e ABCG1 (via

LXR) (BALDÁN et al., 2006; SCHMITZ; LANGMANN, 2005), a regulação assim como a função biológica do ABCG1 ainda não são bem definidas (ITO, 2003; LORKOWSKI; CULLEN, 2004). Um estudo mostrou que a expressão do ABCG1 aumenta aproximadamente 4 vezes mais do que a do ABCA1 em macrófagos humanos derivados de monócitos tratados com agonistas de LXR/*retinoid X receptor* (RXR) (ENGEL et al., 2001). Um outro estudo com macrófagos LXR^{-/-}, agonistas de PPAR γ induziram a expressão de ABCG1, mas não a de ABCA1, mostrando que a indução do ABCG1 pode ocorrer também por um processo independente de LXR (LI et al., 2004). Além disso, assim como para o *ABCA1*, são conhecidos vários transcritos diferentes para o *ABCG1* (KUSUHARA; SUGIYAMA, 2007), o que pode alterar sua regulação gênica em diferentes tecidos.

Resumindo nossos achados *in vitro*, no presente estudo demonstramos que o tratamento com os hipolipemiantes aumentou a quantidade do transcrito *ABCG1*, mas não alterou a do *ABCA1* ou *SCARB1* em células HepG2. Além do mais, altas concentrações de atorvastatina (10 μ M) causaram um aumento na expressão de RNAm dos genes *NR1H3* e *NR1H2*, enquanto o tratamento com ezetimiba causou redução na expressão de *NR1H2*, mas não na de *NR1H3*. Já em células Caco-2, o tratamento com as estatinas isoladas não alterou a expressão do *ABCG1* ou do *SCARB1*, mas diminuiu a do *ABCA1*. Ainda em Caco-2, o tratamento combinado com ezetimiba, mas não a ezetimiba sozinha, diminuiu a transcrição dos genes *ABCA1* e *ABCG1*, sem alterar a do *SCARB1*. Em nenhum desses modelos celulares houve correlação significativa entre as expressões de RNAm dos genes avaliados. Esses resultados sugerem que a regulação da expressão do *ABCA1*, do *ABCG1* e do *SCARB1* exercida pelos hipolipemiantes, além de não ser similar, não sofre influência direta de alterações na transcrição de LXRs nestas células estudadas.

O fígado e, em menor extensão, o intestino são os principais sítios de formação da HDL (BRUNHAM et al., 2006; YOKOYAMA, 2006) e a *ABCA1* é uma molécula importante para a geração de partículas nascentes dessa lipoproteína (ASZTALOS, 2004; CAVELIER et al., 2006; KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006; LEE; PARKS, 2005). De fato, a *ABCA1* intestinal parece colaborar com cerca de 30% de HDL-C circulante (BRUNHAM et al., 2006). Sabendo que os fármacos estudados não alteraram a expressão de RNAm do *ABCA1* no tecido hepático e, com exceção da ezetimiba na concentração estudada, diminuíram a sua transcrição no tecido intestinal, podemos sugerir que os hipolipemiantes não afetam ou afetam

apenas levemente a geração de HDL. Este resultado é concordante com dados obtidos de estudos clínicos que mostram que as estatinas ou a ezetimiba não alteram ou alteram de forma modesta as concentrações séricas de HDL-C ou apo A1, principal constituinte da partícula de HDL (BAYS et al., 2008; MCTAGGART; JONES, 2008; PEARSON et al., 2005; SVIRIDOV; NESTEL; WATTS, 2007).

Um estudo prévio sugeriu diferentes funções para o ABCG1 e ABCA1 em tecido intestinal (FIELD; BORN; MATHUR, 2004) e parece que o ABCG1 não tem papel na absorção lipídica (KENNEDY et al., 2005). Ademais, há indícios na literatura de que o ABCG1 em macrófagos tenha importância no efluxo de colesterol para partículas maduras de HDL, enquanto que o ABCG1 hepático parece secretar colesterol para a bile e modular o colesterol plasmático (ITO, 2003; KUSUHARA; SUGIYAMA, 2007; VELAMAKANNI et al., 2007). O aumento da transcrição de *ABCG1* causado pelos hipolipemiantes em células HepG2 parece, portanto, ser importante para o TRC. Todavia, como nenhum efeito foi observado na expressão proteica desse transportador, novos estudos precisam ser realizados para maior esclarecimento do impacto desses resultados.

Nós também avaliamos a expressão relativa de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1*, *NR1H2* e *NR1H3* em CMSP de 50 indivíduos NL e de 71 HC, antes e após o tratamento farmacológico, 48 dos quais foram tratados com atorvastatina (10mg/dia/ 4semanas) e 23 com ezetimiba (10mg/dia/ 4semanas), sinvastatina (10mg/dia/8 semanas) e terapia combinada de ezetimiba e sinvastatina (10mg/dia/ 4semanas).

A expressão de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1* em CMSP de normolipidêmicos foi similar à expressão basal de hipercolesterolêmicos. Por outro lado, os genes *NR1H2* e *NR1H3* foram mais expressos em CMSP de indivíduos HC quando comparados aos indivíduos NL ($p<0,05$). Outros autores também não encontraram diferenças significativas de expressão de *ABCA1* e do *SCARB1* quando compararam indivíduos diabéticos com hiperlipidêmicos (também diabéticos) não tratados ou com controles saudáveis (GUAN et al., 2008; LI; XU; GU, 2009; ZHOU et al., 2008). De mais a mais, Svensson e colaboradores (2005) constataram que, conquanto o *SCARB1* seja regulado por estímulo proaterogênico em humanos, não houve alteração de expressão de RNAm em macrófagos de indivíduos com aterosclerose ou controles saudáveis. No entanto, a expressão de *ABCG1* em monócitos do sangue periférico foi menor em indivíduos diabéticos quando

comparada à de indivíduos controles saudáveis (LI; XU; GU, 2009; ZHOU et al., 2008).

Em indivíduos HC, a atorvastatina e a sinvastatina diminuíram a expressão de *ABCA1* e *ABCG1* em CMSP. Contrariamente, a pravastatina não modificou a expressão de RNAm e de proteína ABCA1 em leucócitos de camundongos (ANDO et al., 2004) e a sinvastatina (5-10mg/dia) aumentou a expressão de RNAm em células mononucleares de indivíduos com diabetes tipo 2 (GUAN et al., 2008). Contudo, cabe ressaltar que o metabolismo do colesterol em humanos difere bastante do metabolismo em camundongos e que, no nosso estudo, não foram incluídos indivíduos diabéticos, o que pode explicar os diferentes achados.

O efeito da atorvastatina e da sinvastatina sobre a expressão de RNAm do *ABCA1* e *ABCG1* em CMSP são concordantes com trabalhos realizados *in vitro* com macrófagos murinos e humanos tratados com diferentes tipos de estatinas (ANDO et al., 2004; QIU; HILL, 2008; SONE et al., 2004; WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et al., 2008b). Além disso, as estatinas também diminuíram a quantidade de proteína e o efluxo de colesterol mediado pela ABCA1 nessas células (QIU; HILL, 2008; WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et al., 2008b). O mecanismo de redução da expressão e atividade da ABCA1 resulta da inibição da biossíntese de colesterol pelas estatinas com consequente redução de oxisteróis, levando a uma diminuição da ativação da transcrição dos genes ABCA1 e ABCG1 (QIU; HILL, 2008; WONG et al., 2008a; WONG et al., 2008b).

A princípio, o efeito inibitório das estatinas sobre a expressão dos transportadores ABCs avaliados em CMSP e em macrófagos parece ser pró-aterogênico. Entretanto, diversos autores (ANDO et al., 2004; WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et al., 2008b) concordam que essa informação precisa ser mais bem avaliada, principalmente devido ao benefício clínico dessa classe de fármacos. Em macrófagos THP-1 carregados com colesterol, o efeito inibitório da compactina sobre a expressão e efluxo da ABCA1 foi perdido (WONG; QUINN; BROWN, 2004; WONG et al., 2008b). Llaverias e colaboradores (2004) também observaram que a atorvastatina não afeta a expressão de RNAm e proteína ABCA1 em macrófagos humanos tratados com LDL acetilada. Esses resultados sugerem que alterações no *status* de colesterol celular podem alterar o efeito das estatinas sobre a expressão de *ABCA1* e *ABCG1* e sustentam a necessidade de outros estudos para maiores esclarecimentos.

Embora os estudos *in vitro* tenham revelado aumento de expressão de *SCARB1*, em macrófagos humanos e em monócitos em diferenciação, por pitavastatina ou atorvastatina (HAN et al., 2004; LLAVERIAS et al., 2006), *in vivo* não observamos efeito de estatinas e ezetimiba sobre a expressão desse gene em CMSP de indivíduos HC. Semelhantemente ao que ocorreu em nossos achados, a sinvastatina (5-10 mg/dia) não alterou a expressão de *SCARB1* em CMSP de indivíduos diabéticos (GUAN et al., 2008).

Corroborando os resultados dos efeitos das estatinas sobre a atividade de LXR em macrófagos (WONG et al., 2008b), nossos resultados indicam que, em CMSP de HC tratados com hipolipemiantes, a diminuição da transcrição de *ABCA1* ou *ABCG1* não foi devida a alterações diretas na expressão de RNAm dos LXRs. Isso porque não foram encontradas alterações na expressão de RNAm do *NR1H2* e *NR1H3*, nessas células, após o tratamento com atorvastatina ou sinvastatina. Ao contrário dos nossos resultados em CMSP, Guan e colaboradores (2008) relataram um aumento da expressão de *NR1H3* em pacientes diabéticos após tratamento com sinvastatina. Em leucócitos murinos, o tratamento com pravastatina também aumentou a transcrição do *Nr1h3* (ANDO et al., 2004). Mas, como explicado acima, esses estudos foram realizados com pacientes diabéticos ou com camundongos, o que pode explicar as diferenças encontradas.

Diferente dos resultados obtidos *in vivo*, em células HepG2 o tratamento com 10,0 μ M de atorvastatina causou aumento da expressão dos genes *NR1H2* e *NR1H3*, como comentado anteriormente. Provavelmente esse resultado se deva ao fato de que as células da linhagem hepática foram expostas a concentrações de atorvastatina maiores do que aquelas presentes na corrente sanguínea dos pacientes tratados. Segundo Mohammadi e colaboradores (1998), assumindo completa absorção do fármaco, 10 mg de atorvastatina cálcica resultam em concentrações plasmáticas, em um homem de 70kg com volume sanguíneo de 5L, de aproximadamente 1,8 μ M.

Interessantemente, nós também demonstramos o efeito inibitório da ezetimiba, associado ou não com a sinvastatina, sobre a expressão dos genes *ABCA1* e *ABCG1*. Portanto, nossos achados sugerem que o tratamento com ezetimiba (10mg/dia/4semanas) pode diminuir a disponibilidade de oxisteróis, ligantes de LXR, em CMSP. No entanto, outros estudos são necessários para

confirmar se o mecanismo de ação da ezetimiba sobre a expressão desses genes está relacionado ou não com outras vias metabólicas da célula.

Especialmente em macrófagos, estudos têm mostrado que os genes *ABCA1* e *ABCG1* têm sua transcrição regulada de forma similar por várias substâncias ou fármacos (SCHMITZ; LANGMANN, 2005). Nesse trabalho, foram observadas correlações positivas entre esses dois genes em CMSP de normolipidêmicos e de hipercolesterolêmicos, antes ou após as terapias com estatinas e/ou ezetimiba. Moustafa e colaboradores (2004) também verificaram forte correlação na expressão desses dois genes em leucócitos obtidos de sangue periférico de pacientes saudáveis ou portadores de carcinoma hepatocelular.

Nós não observamos correlação entre as expressões de *ABCA1* e *ABCG1* em CMSP e o perfil lipídico sérico, especialmente HDL-C e apo AI, dos pacientes analisados. Provavelmente porque o modelo de células utilizado (CMSP) não seja ideal para esta análise. Haghpasand e colaboradores (2001) verificaram, em camundongos, que a contribuição da *ABCA1* de monócitos/macrófagos para a formação de HDL plasmática total era mínima.

Também avaliamos, neste trabalho, a relação entre a expressão de RNAm do *ABCA1* e os polimorfismos C-14T e R219K. Interessante é que nós verificamos maior expressão basal de *ABCA1* em CMSP de indivíduos HC portadores dos genótipos -14CT+TT quando comparados aos portadores do genótipo -14CC ($p=0,034$). Em concordância com esse resultado, foi observado que o alelo -14T resulta em maior atividade transcricional do *ABCA1* em células HepG2, COS-7 e *Chinese hamster ovary* (CHO) (HODOGLUGIL et al., 2005). Esses resultados sugerem que o polimorfismo C-14T pode influenciar na regulação da transcrição do *ABCA1*. Tem sido notado que alterações nas regiões promotoras de vários genes podem alterar a expressão gênica por mudanças na afinidade ou especificidade de ligação dos fatores de transcrição ou ainda por alterações na cinética de transcrição (KIM et al., 2005).

Após o tratamento com atorvastatina, a relação entre a presença do alelo -14T e o aumento da expressão de RNAm do *ABCA1* não foi mantida em indivíduos HC. Zwarts e colaboradores (2002) estudaram a associação entre o SNP C-14T e a progressão da aterosclerose em pacientes portadores de DAC, tratados com pravastatina, e concluíram que o fármaco foi capaz de reverter o efeito de progressão da aterosclerose associado ao alelo -14T.

Até agora, as mudanças causadas pela presença do SNP C-14T permanecem incertas. Embora nós e outros autores (GENVIGIR et al., 2008; TAN et al., 2003; ZWARTS et al., 2002) não tenhamos encontrado associação entre o polimorfismo C-14T do *ABCA1* e alterações nas concentrações de lipídeos plasmáticos, a presença do alelo -14T foi associada com o aumento de HDL-C em homens turcos ou chineses (HODOGLUGIL et al., 2005; TAN et al., 2003). Um estudo realizado em camundongos, deficientes de ABCA1 leucocitária, mostrou que a ABCA1 em leucócitos desempenha um papel crítico na proteção contra a aterosclerose e os autores sugeriram que outros mecanismos, que operam independentemente da HDL plasmática, podem ser responsáveis por esse efeito (VAN ECK et al., 2002).

Finalmente, é importante apontar algumas limitações desse estudo. Primeiro, nossas análises *in vivo* foram limitadas a um número pequeno de indivíduos e, por conseguinte, são necessários estudos adicionais com maior número de indivíduos para confirmar nossos achados. Segundo, como o TRC é um processo complexo e que envolve vários tecidos, a escolha de um modelo celular que permita avaliar o efeito dos fármacos sobre a expressão de genes envolvidos nesse processo é uma tarefa desafiadora, especialmente falando-se de estudos com seres humanos. Nós realizamos nossos estudos em CMSP, pois essas células são facilmente acessíveis e úteis como biomarcadores da influência dos hipolipemiantes no tecido periférico *in vivo*. Contudo, a expressão dos genes avaliados em CMSP pode não refletir o perfil de expressão de macrófagos na parede arterial. Da mesma forma, as linhagens celulares HepG2 e Caco-2 não são modelos celulares ideais por serem derivadas de hepatoma ou adenocarcinoma colorretal, respectivamente, e também por não estarem inseridas em um sistema biológico. No entanto, são linhagens facilmente cultiváveis em laboratório.

6 CONCLUSÕES

O perfil de expressão basal dos genes avaliados diferiu nos modelos de células humanas periféricas, hepáticas ou intestinais, neste estudo. Em CMSP, os genes *NR1H2* e *ABCG1* foram os mais expressos, seguidos pelos genes *SCARB1* e *ABCA1* e, finalmente, pelo *NR1H3*. Nas células HepG2, o *SCARB1* foi o mais expresso, seguido por *NR1H2*, *NR1H3*, *ABCG1* e *ABCA1*. O *SCARB1* também foi o gene mais expresso em células Caco-2, seguido pelo *ABCA1* e *ABCG1*.

Em CMSP, a hipercolesterolemia não influenciou a expressão basal de RNAm do *ABCA1*, *ABCG1* e *SCARB1*, mas influenciou a transcrição de *NR1H2* e *NR1H3*. Além disso, a expressão do *ABCA1* foi modulada pela interação entre o polimorfismo C-14T e a hipercolesterolemia. Para o polimorfismo R219K nenhuma interação foi encontrada.

Coletivamente, nossos resultados demonstram que os tratamentos com os fármacos inibidores de síntese (estatinas) e/ou absorção (ezetimiba) do colesterol causam diminuição da transcrição de *ABCA1* e *ABCG1* em CMSP de indivíduos HC. Esse efeito dos hipolipemiantes nessas células humanas periféricas difere daqueles observados em células de linhagem hepática (HepG2) ou intestinal (Caco-2), sugerindo a existência de regulação gênica tecido-específica para os dois transportadores ABC.

A expressão de RNAm do *SCARB1* não foi modulada por estatinas e/ou ezetimiba nas CMSP ou nas linhagens HepG2 e Caco-2.

Em células periféricas ou hepáticas tratadas com os hipolipemiantes, a expressão do *ABCA1*, *ABCG1* ou *SCARB1* não foi correlacionada com a transcrição de *NR1H2* ou *NR1H3*. Esses resultados sugerem que, nessas células, o efeito das estatinas ou da ezetimiba sobre a expressão do *ABCA1*, do *ABCG1* ou do *SCARB1* não sofreu influência de alterações diretas da transcrição dos LXRs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ANDO, H.; TSURUOKA, S.; YAMAMOTO, H.; TAKAMURA, T.; KANEKO, S.; FUJIMURA, A. Effects of pravastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter A1. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 311, n. 1, p. 420-425, 2004.

ARGMANN, C. A.; EDWARDS, J. Y.; SAWYEZ, C. G.; O'NEIL, C. H.; HEGELE, R. A.; PICKERING, J. G.; HUFF, M. W. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 23, p. 22212-22221, 2005.

ASZTALOS, B. F. High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. **Curr Opin Cardiol.**, v. 19, n. 4, p. 385-391, 2004.

AYE, I. L.; SINGH, A. T.; KEELAN, J. A. Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. **Chem Biol Interact.**, v. 180, n. 3, p. 327-339, 2009.

BALDÁN, A.; TARR, P.; LEE, R.; EDWARDS, P. A. ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. **Curr Opin Lipidol.**, v. 17, n. 3, p. 227-232, 2006.

BAYS, H. E. ; NEFF, D. ; TOMASSINI, J. E.; TERSHAKOVEC, A. M. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. **Expert Rev Cardiovasc Ther.**, v. 6, n. 4, p. 447-470, 2008.

BAYS, H.; STEIN, E. A. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. **Expert Opin Pharmacother.**, v. 4, n. 11, p. 1901-1938, 2003.

BONN, V.; CHEUNG, R. C.; CHEN, B.; TAGHIBIGLOU, C.; VAN IDERSTINE, S. C.; ADELI, K. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. **Atherosclerosis**, v. 163, n. 1, p. 59-68, 2002.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIAND, F.; MAGOT, T.; KREMPF, M.; NGUYEN, P.; OUGUERRAM, K. Effects of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs. **Eur J Clin Invest.**, v. 36, n. 4, p. 224-230, 2006. Errata em: **Eur J Clin Invest.**, v. 36, n. 7, p. 518, 2006.

BRUNHAM, L. R.; KRUIT, J. K.; IQBAL, J.; FIEVET, C.; TIMMINS, J. M.; PAPE, T. D.; COBURN, B. A.; BISSADA, N.; STAELS, B.; GROEN, A. K.; HUSSAIN, M. M.; PARKS, J. S.; KUIPERS, F.; HAYDEN, M. R. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 4, p. 1052-1062, 2006.

BRUNHAM, L. R.; SINGARAJA, R. R.; HAYDEN, M. R. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. **Annu Rev Nutr.**, v. 26, p. 105-129, 2006.

CAVELIER, C.; LORENZI, I.; ROHRER, L.; VON ECKARDSTEIN, A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 7, p. 655-666, 2006.

CERDA, A.; GENVIGIR, F. D.; ARAZI, S. S.; HIRATA, M. H.; DOREA, E. L.; BERNIK, M. M.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; HIRATA, R. D. Influence of SCARB1 polymorphisms on serum lipids of hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin. **Clin Chim Acta.**, v. 411, n. 9-10, p. 631-637, 2010.

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

CHOMCZYNSKY, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 1993.

DAVIGNON, J.; DUBUC, G. Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) levels. **Trans Am Clin Climatol Assoc.**, v. 120, p. 163-173, 2009.

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

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

DIBLASIO-SMITH, E. A.; ARAI, M.; QUINET, E. M.; EVANS, M. J.; KORNAGA, T.; BASSO, M. D.; CHEN, L.; FEINGOLD, I.; HALPERN, A. R.; LIU, Q. Y.; NAMBI, P.; SAVIO, D.; WANG, S.; MOUNTS, W. M.; ISLER, J. A.; SLAGER, A. M.; BURCZYNSKI, M. E.; DORNER, A. J.; LAVALLIE, E. R. Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. **J Transl Med.**, v. 6, p.59, 2008.

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

ENGEL, T.; LORKOWSKI, S.; LUEKEN, A.; RUST, S.; SCHLÜTER, B.; BERGER, G.; CULLEN, P.; ASSMANN, G. The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 288, n. 2, p. 483-488, 2001.

FIELD, F. J.; BORN, E.; MATHUR, S. N. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. **J Lipid Res.**, v. 45, n.12, p. 2252-2259, 2004.

FIELD, F. J.; WATT, K.; MATHUR, S. N. Origins of intestinal ABCA1-mediated HDL-cholesterol. **J Lipid Res.**, v. 49, n. 12, p. 2605-2619, 2008.

FRANCESCHINI, G.; CALABRESI, L.; COLOMBO, C.; FAVARI, E.; BERNINI, F.; SIRTORI, C. R. Effects of fenofibrate and simvastatin on HDL-related biomarkers in low-HDL patients. **Atherosclerosis**, v. 195, n. 2, p. 385-391, 2007.

GENVIGIR, F. D.; SOARES, S. A.; HIRATA, M. H.; WILLRICH, M. A.; ARAZI, S. S.; REBECCHI, I. M.; OLIVEIRA, R.; BERNIK, M. M.; DOREA, E. L.; BERTOLAMI, M. C.; HIRATA, R. D. Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. **Clin Chim Acta.**, v. 389, n. 1-2, p. 79-86, 2008.

GOLDSTEIN, J. L.; DEBOSE-BOYD, R. A.; BROWN, M. S. Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 35-46, 2006.

GORDON, D. J.; PROBSTFIELD, J. L.; GARRISON, R. J.; NEATON, J. D.; CASTELLI, W. P.; KNOKE, J. D.; JACOBS JUNIOR, D. R.; BANGDIWALA, S.; TYROLER, H. A. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1989.

GRIGORE, L.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. **Vasc Health Risk Manag.**, v. 4, n. 2, p. 267-278, 2008.

GUAN, J. Z.; TAMASAWA, N.; MURAKAMI, H.; MATSUI, J.; TANABE, J.; MATSUKI, K.; YAMASHITA, M.; SUDA, T. HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. **J Atheroscler Thromb.**, v. 15, n. 1, p. 20-25, 2008.

HAGHPASSAND, M.; BOURASSA, P. A.; FRANCONI, O. L.; AIELLO, R. J. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. **J Clin Invest.**, v. 108, n. 9, p. 1315-1320, 2001.

HAN, J.; PARSONS, M.; ZHOU, X.; NICHOLSON, A. C.; GOTTO JUNIOR, A. M.; HAJJAR, D. P. Functional interplay between the macrophage scavenger receptor class B type I and pitavastatin (NK-104). **Circulation**, v. 110, n. 22, p. 3472-3479, 2004.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. **Postgrad Med J.**, v. 84, n. 997, p. 590-598, 2008.

HAUSER, H.; DYER, J. H.; NANDY, A.; VEGA, M. A.; WERDER, M.; BIELIAUSKAITE, E.; WEBER, F. E.; COMPASSI, S.; GEMPERLI, A.; BOFFELLI, D.; WEHRLI, E.; SCHULTHESS, G.; PHILLIPS, M. C. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p. 17843-17850, 1998.

HODOGLUGIL, U.; WILLIAMSON, D. W.; HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Common polymorphisms of ATP binding cassette transporter A1, including a functional promoter polymorphism, associated with plasma high density lipoprotein cholesterol levels in Turks. **Atherosclerosis**, v. 183, n. 2, p. 199-212, 2005.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immun.**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

ITO, T. Physiological function of ABCG1. **Drug News Perspect.**, v. 16, n. 8, p. 490-492, 2003.

KENNEDY, M. A.; BARRERA, G. C.; NAKAMURA, K.; BALDÁN, A.; TARR, P.; FISHBEIN, M. C.; FRANK, J.; FRANCONI, O. L.; EDWARDS, P. A. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. **Cell Metab.**, v. 1, n. 2, p. 121-131, 2005.

KIELAR, D.; DIETMAIER, W.; LANGMANN, T.; ASLANIDIS, C.; PROBST, M.; NARUSZEWICZ, M.; SCHMITZ, G. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. **Clin Chem.**, v. 47, n. 12, p. 2089-2097, 2001.

KIM, J. Y.; MOON, S. M.; RYU, H. J.; KIM, J. J.; KIM, H. T.; PARK, C.; KIM, K.; OH, B.; LEE, J. K. Identification of regulatory polymorphisms in the TNF-TNF receptor superfamily. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 297-303, 2005.

KLOS, K. L.; KULLO, I. J. Genetic determinants of HDL: monogenic disorders and contributions to variation. **Curr Opin Cardiol.**, v. 22, n.4, p. 344-351, 2007.

KOSOGLOU, T.; STATKEVICH, P.; JOHNSON-LEVONAS, A. O.; PAOLINI, J. F.; BERGMAN, A. J.; ALTON, K. B. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. **Clin Pharmacokinet.**, v. 44, n. 5, p. 467-494, 2005.

KRIMBOU, L.; MARCIL, M.; GENEST, J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. **Curr Opin Lipidol.**, v. 17, n. 3, p. 258-267, 2006.

KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). **Pflugers Arch.**, v. 453, n. 5, p. 735-744, 2007.

LEE, J. Y.; PARKS, J. S. ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation. **Curr Opin Lipidol.**, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005.

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. 1221–1232, 2005.

LI, A. C.; BINDER, C. J.; GUTIERREZ, A.; BROWN, K. K.; PLOTKIN, C. R.; PATTISON, J. W.; VALLEDOR, A. F.; DAVIS, R. A.; WILLSON, T. M.; WITZTUM, J. L.; PALINSKI, W.; GLASS, C. K. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. **J Clin Invest.**, v. 114, n. 11, p. 1564-1576, 2004.

LI, C.; XU, M.; GU, Q. ATP binding cassette transporter G1 gene expression is reduced in type 2 diabetic patients. **Endocr J.**, v. 56, n. 2, p. 313, 2009.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIU, Y.; ORDOVAS, J. M.; GAO, G.; PROVINCE, M.; STRAKA, R. J.; TSAI, M. Y.; LAI, C. Q.; ZHANG, K.; BORECKI, I.; HIXSON, J. E.; ALLISON D. B.; ARNETT, D. K. The SCARB1 gene is associated with lipid response to dietary and pharmacological interventions. **J Hum Genet.**, v. 53, n. 8, p. 709-717, 2008.

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. 402-408, 2001.

LLAVERIAS, G.; LACASA, D.; VIÑALS, M.; VÁZQUEZ-CARRERA, M.; SÁNCHEZ, R. M.; LAGUNA, J. C.; ALEGRET, M. Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. **Biochem Pharmacol.**, v. 68, n. 1, p. 155-163, 2004.

LLAVERIAS, G.; REBOLLO, A.; POU, J.; VÁZQUEZ-CARRERA, M.; SÁNCHEZ, R. M.; LAGUNA, J. C.; ALEGRET, M. Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. **Biochem Pharmacol.**, v. 71, n. 5, p. 605-614, 2006.

LORKOWSKI, S.; CULLEN, P. Genetics and molecular biology: the ABC of cholesterol efflux and high-density lipoprotein formation. **Curr Opin Lipidol.**, v. 15, n. 5, p. 611-613, 2004.

LORKOWSKI, S.; RUST, S.; ENGEL, T.; JUNG, E.; TEGELKAMP, K.; GALINSKI, E. A.; ASSMANN, G.; CULLEN, P. Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 280, n. 1, p. 121-131, 2001.

LUTUCUTA, S.; BALLANTYNE, C. M.; ELGHANNAM, H.; GOTTO JUNIOR, A.M.; MARIAN, A. J. Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. **Circ Res.**, v. 88, n. 9, p. 969–973, 2001.

MAEJIMA, T.; YAMAZAKI, H.; AOKI, T.; TAMAKI, T.; SATO, F.; KITAHARA, M.; SAITO, Y. Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 324, n. 2, p. 835-839, 2004.

MCTAGGART, F.; JONES, P. Effects of statins on high-density lipoproteins: a potential contribution to cardiovascular benefit. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 22, n. 4, p. 321-338, 2008.

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

MOUSTAFA, M. A.; OGINO, D.; NISHIMURA, M.; UEDA, N.; NAITO, S.; FURUKAWA, M.; UCHIDA, T.; IKAI, I.; SAWADA, H.; FUKUMOTO, M. Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 6, p. 530-536, 2004.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods.**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

NOFER, J. R.; REMALEY, A. T. Tangier disease: still more questions than answers. **Cell Mol Life Sci.**, v. 62, n. 19-20, p. 2150-2160, 2005.

OOSTERVEER, M. H.; GREFFHORST, A.; GROEN, A. K.; KUIPERS, F. The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. **Prog Lipid Res.**, v. 49, n.4, p. 343-352, 2010.

PARINI, P.; GUSTAFSSON, U.; DAVIS, M. A.; LARSSON, L.; EINARSSON, C.; WILSON, M.; RUDLING, M.; TOMODA, H.; OMURA, S.; SAHLIN, S.; ANGELIN, B.; RUDEL, L. L.; ERIKSSON, M. Cholesterol synthesis inhibition elicits an integrated molecular response in human livers including decreased ACAT2. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 28, n. 6, p. 1200-1206, 2008.

PEARSON, T. A.; DENKE, M. A.; MCBRIDE, P. E.; BATTISTI, W. P.; BRADY, W. E.; PALMISANO, J. A community-based, randomized trial of ezetimibe added to statin therapy to attain NCEP ATP III goals for LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients: the ezetimibe add-on to statin for effectiveness (EASE) trial. **Mayo Clin Proc.**, v. 80, n. 5, p. 587-595, 2005.

QIU, G.; HILL, J. S. Atorvastatin inhibits ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1 macrophages by an LXR-dependent pathway. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 51, n. 4, p. 388-395, 2008.

RADER, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 12, p. 3090-3100, 2006.

REPA, J. J.; DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte. **J Lipid Res.**, v. 43, n. 11, p. 1864-1874, 2002.

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

RHAINDS, D.; BRISSETTE, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking: defining the rules for lipid traders. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 36, n. 1, p. 39-77, 2004.

RODRIGUES, A. C. **Efeito da atorvastatina sobre a atividade funcional e expressão de transportadores de membrana do tipo ABC e SLC.** 2008. 176 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RODRIGUES, A. C.; CURI, R.; GENVIGIR, F. D.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 30, n. 7, p. 956-964, 2009.

SABOL, S. L.; BREWER JUNIOR, H. B.; SANTAMARINA-FOJO, S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. **J Lipid Res.**, v. 46, n. 10, p. 2151-2167, 2005.

SADEGHI, M. M.; COLLINGE, M.; PARDI, R.; BENDER, J. R. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. **J Immunol.**, v. 165, n. 5, p. 2712-2718, 2000.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, S. A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R. D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem.**, v. 44, n. 8, pt. 1, p. 1748-1750, 1998.

SALAZAR, L. N.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R.D.C. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor da LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **Rev Bras Anál Clín.**, v. 32, n. 3, p. 195-199, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANÉ, A. T. ; SINNETT, D. ; DELVIN, E. ; BENDAYAN, M. ; MARCIL, V. ; MÉNARD, D. ; BEAULIEU, J. F.; LEVY, E. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. **J Lipid Res.**, v. 47, n. 10, p. 2112-2120, 2006.

SANTAMARINA-FOJO, S.; PETERSON, K.; KNAPPER, C.; QIU, Y.; FREEMAN, L.; CHENG, J. F.; OSORIO, J.; REMALEY, A.; YANG, X. P.; HAUDENSCHILD, C.; PRADES, C.; CHIMINI, G.; BLACKMON, E.; FRANCOIS, T.; DUVERGER, N.; RUBIN, E. M.; ROSIER, M.; DENEFLÉ, P.; FREDRICKSON, D. S.; BREWER JUNIOR, H. B. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, n. 14, p. 7987-7992, 2000. Errata em: **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 2, p. 1098, 2002.

SCHMITZ, G.; DROBNIK, W. Pharmacogenomics and pharmogenetics of cholesterol-lowering therapy. **Clin Chem Lab Med.**, v. 41, n. 4, p. 581-589, 2003.

SCHMITZ, G.; LANGMANN, T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. **Vascul Pharmacol.**, v. 44, n. 2, p. 75-89, 2006.

_____. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1735, n. 1, p. 1-19, 2005.

SEEDORF, U.; ENGEL, T.; LUEKEN, A.; BODE, G.; LORKOWSKI, S.; ASSMANN, G. Cholesterol absorption inhibitor Ezetimibe blocks uptake of oxidized LDL in human macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 320, n. 4, p. 1337-1341, 2004.

SIEST, G.; FERRARI, L.; ACCAOUCI, M. J.; BATT, A. M.; VISVIKIS, S. Pharmacogenomics of drugs affecting the cardiovascular system. **Clin Chem Lab Med.**, v. 41, n. 4, p. 590-599, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 88, p.2-19, 2007. Suplemento 1.

SONE, H.; SHIMANO, H.; SHU, M.; NAKAKUKI, M.; TAKAHASHI, A.; SAKAI, M.; SAKAMOTO, Y.; YOKOO, T.; MATSUZAKA, K.; OKAZAKI, H.; NAKAGAWA, Y.; IIDA, K. T.; SUZUKI, H.; TOYOSHIMA, H.; HORIUCHI, S.; YAMADA, N. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 316, n. 3, p. 790-794, 2004.

STEINBERG, D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 11, p. 995-998, 2005.

SVENSSON, P. A.; ENGLUND, M. C.; SNÄCKESTRAND, M. S.; HÄGG, D. A.; OHLSSON, B. G.; STEMME, V.; MATTSSON-HULTEN, L.; THELLE, D. S.; FAGERBERG, B.; WIKLUND, O.; CARLSSON, L. M.; CARLSSON, B. Regulation and splicing of scavenger receptor class B type I in human macrophages and atherosclerotic plaques. **BMC Cardiovasc Disord.**, v. 5, p. 25, 2005.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P.; WATTS, G. Statins and metabolism of high density lipoprotein. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v. 5, n. 3, p. 215-221, 2007.

TABET, F.; RYE, K. A. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. **Clin Sci (Lond).**, v. 116, n. 2, p. 87-98, 2009.

TALL, A. R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. **J Intern Med.**, v. 263, n. 3, p. 256-273, 2008.

TAMEHIRO, N.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KAKEYA, T.; OKUHIRA, K.; SUZUKI, K.; SATO, R.; NAGAO, T.; NISHIMAKI-MOGAMI, T. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic

ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 29, p. 21090-21099, 2007.

TAN, J. H.; LOW, P. S.; TAN, Y. S.; TONG, M. C.; SAHA, N.; YANG, H.; HENG, C. K. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. **Hum Genet.**, v. 113, n. 2, p. 106-117, 2003.

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

TOTH, P. P. Novel therapies for increasing serum levels of HDL. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v. 38, n. 1, p. 151-170, 2009.

TRIGATTI, B.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. **Curr Opin Lipidol.**, v. 11, n. 2, p. 123-131, 2000.

TSURUOKA, H.; KHOVIDHUNKIT, W.; BROWN, B. E.; FLUHR, J. W.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Scavenger receptor class B type I is expressed in cultured keratinocytes and epidermis. Regulation in response to changes in cholesterol homeostasis and barrier requirements. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 4, p. 2916-2922, 2002.

VAN DER VELDE, A. E. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. **World J Gastroenterol.**, v. 16, n. 47, p. 5908-5915, 2010.

VAN DER VELDE, A. E.; GROEN, A. K. Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 10, p. 2699-2701, 2005.

VAN ECK, M.; BOS, I. S.; KAMINSKI, W. E.; ORSÓ, E.; ROTHE, G.; TWISK, J.; BÖTTCHER, A.; VAN AMERSFOORT, E. S.; CHRISTIANSEN-WEBER, T. A.; FUNG-LEUNG, W. P.; VAN BERKEL, T. J.; SCHMITZ, G. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 9, p. 6298-6303, 2002.

VAN ECK, M.; PENNING, M.; HOEKSTRA, M.; OUT, R.; VAN BERKEL, T. J. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse

cholesterol transport and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.**, v. 16, n. 3, p. 307-315, 2005.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, RESEARCH0034, 2002.

VAUGHAN, A. M.; ORAM, J. F. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 34, p. 30150-30157, 2005.

VAUGHAN, C. J.; GOTTO JUNIOR, A. M. Update on statins: 2003. **Circulation**, v. 110, n. 7, p. 886-892, 2004.

VELAMAKANNI, S.; WEI, S. L.; JANVILISRI, T.; VAN VEEN, H. W. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles: a brief overview. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 39, n. 5-6, p. 465-471, 2007.

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, 2008.

WELLINGTON, C. L.; WALKER, E. K.; SUAREZ, A.; KWOK, A.; BISSADA, N.; SINGARAJA, R.; YANG, Y. Z.; ZHANG, L. H.; JAMES, E.; WILSON, J. E.; FRANCONI, O.; MCMANUS, B. M.; HAYDEN, M. R. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. **Lab Invest.**, v. 82, n. 3, p. 273-283, 2002.

WONG, J.; QUINN, C. M.; BROWN, A. J. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, n. 12, p. 2365-2371, 2004.

WONG, J.; QUINN, C. M.; GELISSEN, I. C.; BROWN, A. J. Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. **J Biol Chem.**, v. 283, n. 2, p. 700-707, 2008a.

WONG, J.; QUINN, C. M.; GELISSEN, I. C.; JESSUP, W.; BROWN, A. J. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 180-189, 2008b.

YAMANASHI, Y.; TAKADA, T.; SUZUKI, H. Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 320, n. 2, p. 559-564, 2007.

YANCEY, P. G.; BORTNICK, A. E.; KELLNER-WEIBEL, G.; de la LLERA-MOYA, M.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 23, n. 5, p. 712-719, 2003.

YOKOYAMA, S. Assembly of high-density lipoprotein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 26, n. 1, p. 20-27, 2006.

ZANNIS, V. I.; CHRONI, A.; KRIEGER, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **J Mol Med.**, v. 84, n. 4, p. 276-294, 2006.

ZANOTTI, I.; FAVARI, E.; SPOSITO, A. C.; ROTHBLAT, G. H.; BERNINI, F. Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 321, n. 3, p. 670-674, 2004.

ZHOU, H.; TAN, K. C.; SHIU, S. W.; WONG, Y. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus. **Metabolism.**, v. 57, n. 8, p. 1135-1140, 2008.

ZWARTS, K. Y.; CLEE, S. M.; ZWINDERMAN, A. H.; ENGERT, J. C.; SINGARAJA, R.; LOUBSER, O.; JAMES, E.; ROOMP, K.; HUDSON, T. J.; JUKEMA, J. W.; KASTELEIN, J. J.; HAYDEN, M. R. ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. **Clin Genet.**, v. 61, n. 2, p. 115-125, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Efeito da sinvastatina na morfologia, proliferação, viabilidade e fragmentação de DNA em células HepG2

Observa-se na **Figura 22** que o tratamento com sinvastatina afetou a morfologia celular e a proliferação das células HepG2, após 48 horas de tratamento nas concentrações de 1 (discretamente) e 10 μ M. Isso provavelmente se deva ao fato da estatina inibir a via do mevalonato, importante para a manutenção e crescimento celular.

Figura 22 - Morfologia de células HepG2, após 48 h de tratamento com sinvastatina

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

Para avaliarmos numericamente o efeito da estatina na proliferação celular da HepG2, realizamos curvas de crescimento para cada tratamento com concentrações variáveis (0 a 10 μ M) de sinvastatina por um período de até 120 horas. Esta análise foi realizada a partir da contagem das células aderidas e os dados obtidos neste experimento são decorrentes de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Na **Figura 23**, observa-se que a sinvastatina exerce um efeito antiproliferativo no crescimento celular dos hepatócitos a altas concentrações (10 μM), a partir de 72 horas de tratamento. Embora em 48 horas de tratamento se observe uma grande redução no número de células, este resultado não foi estatisticamente significativo, pois as análises foram realizadas com relação ao tempo inicial do experimento (e não com relação ao tempo anterior de cada ponto).

Figura 23 - Curva de proliferação das células HepG2 após tratamento com sinvastatina

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

O efeito da sinvastatina sobre a viabilidade celular e fragmentação do DNA em células HepG2 foi avaliado por até 72 horas. O tratamento com as concentrações 0,01 a 1 μM não afetou a viabilidade ou a fragmentação de DNA nas células HepG2 (**Figura 24**). As células apresentaram viabilidade em torno de 97% e a fragmentação do DNA foi em média 9%. Todavia, a partir de 48 horas de tratamento, a sinvastatina a 10 μM diminuiu a viabilidade e a porcentagem de DNA não fragmentado, conforme as **Figuras 24A e 24B**.

Figura 24 - Efeito da sinvastatina na viabilidade (A) e fragmentação do DNA (B) das células HepG2

Nota: A integridade de membrana das células HepG2 e a porcentagem de DNA fragmentado foram analisadas por citometria de fluxo ($n=3$ a 6) após 12 a 72 horas de tratamento com concentrações variáveis de sinvastatina (0 a $10\ \mu\text{M}$). ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ quando comparado com controle ($0\ \mu\text{M}$), pela análise de Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Na análise de ciclo celular das células HepG2 (**Figura 25**), a sinvastatina causou uma parada de ciclo celular em fase G1 com diminuição da porcentagem de células em fase S e fase G2, após 24 horas de tratamento na concentração de $10\ \mu\text{M}$. A parada do ciclo celular em G1 já era esperada, porquanto a sinvastatina inibe a HMGCoA redutase que converte HMGCóA em mevalonato, substrato importante na passagem da célula da fase G1 para a S. Com relação às outras concentrações de sinvastatina utilizadas no experimento, podemos concluir que são subdoses para as células HepG2, e assim não são capazes de inibir a HMGCoA redutase a ponto de causar parada de ciclo celular.

Após 48 horas de tratamento, a sinvastatina a 10 μM também induziu a apoptose das células HepG2, com consequente diminuição do número de células em G1 e G2. Ao relacionarmos os dados de ciclo celular com os de proliferação celular, podemos concluir que a análise de ciclo celular é mais sensível que a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer por analisar diretamente o conteúdo de DNA.

Figura 25 - Efeito da sinvastatina no ciclo celular das células HepG2

Nota: n=3 ou 4. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado com controle (0 μM), pela análise de Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

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

SPECIAL REPORT

ABCA1 expression and statins: inhibitory effect in peripheral blood mononuclear cells

The ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) has an essential role in the formation of nascent high-density lipoprotein particles and also participates in the cholesterol efflux from macrophages in the artery wall. Several substances, such as statins, or even gene variants are able to modulate *ABCA1* expression. There is strong evidence that statin treatment downregulates the *ABCA1* expression in nonloaded macrophages. Interestingly, in cholesterol-loaded macrophages, which are more relevant to atherogenesis, this effect is lost. We observed an inhibitory effect of atorvastatin in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals. Moreover, in these individuals, the *ABCA1* -14C>T polymorphism was associated with high baseline gene-expression levels. Other studies are needed to evaluate how relevant these findings are to the formation of arterial foam cells *in vivo*.

KEYWORDS: *ABCA1* gene expression HDL mononuclear cells SNP statins

High-density lipoprotein & *ABCA1*

Plasma high-density lipoprotein (HDL) levels demonstrate a strong independent inverse relationship with atherosclerotic cardiovascular disease [1]. This relationship is supported by the potential anti-atherogenic properties of HDL, which are able to maintain normal macrophage lipid homeostasis [2]. In particular, the involvement of HDL in reverse cholesterol transport (RCT) is considered to be the most important process in preventing atherosclerotic cardiovascular disease [3].

In RCT, HDL mobilizes excess cholesterol and other lipids from peripheral tissues and delivers them to the liver and steroidogenic organs [4].

The ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) has an essential role in the regulation of HDL metabolism [5,6] and there is strong evidence that *ABCA1* is also a key regulator of RCT [7]. This protein mediates the transport of cholesterol, phospholipids and other lipophilic molecules across cellular membranes, where they are removed from cells by lipid-poor HDL apolipoproteins [8]. In fact, *ABCA1*-mediated assembly of phospholipid and free cholesterol with apolipoprotein A-I (ApoA1) plays an important role in HDL biogenesis [3,9], mainly in the liver and, to a lesser extent in the small intestine [10].

The physiological relevance of this protein is supported by the fact that mutations in the *ABCA1* cause Tangier disease and familial hypoalphalipoproteinemia, characterized by a

deficiency in cholesterol efflux from cells and reduced HDL-cholesterol (HDL-C) in serum, as well as an increased risk of atherosclerosis [11–15].

Similar to patients with Tangier disease, targeted disruption of *Abca1* in mice causes HDL deficiency and a reduction in cellular cholesterol efflux activity [16,17]. On the contrary, overexpressed *Abca1* in mice elevates HDL plasma levels [18,19].

Regulation of *ABCA1* expression

ABCA1 is located on chromosome 9q, spans 149 kb and is comprised of 50 exons, of which 49 encode a 2261 amino acid protein [20–22].

ABCA1 is widely expressed throughout animal tissues. The lowest amount of human transcripts was detected in the pancreas and heart. On the contrary, *ABCA1* mRNA was reported to be abundantly expressed in the liver, placenta and small intestine [23]. Moreover, the strongest expression was observed in macrophages loaded with enzymatically modified low-density lipoprotein (LDL), which is a cholesterol-rich lipoprotein. The activation of *ABCA1* transcription in cholesterol-overloaded cells is expected since the transporter mediates the secretion of excess cellular cholesterol [8,23]. This inductive effect is regulated by the nuclear receptors liver X receptor (*LXR*) α and β that form a heterodimer with the retinoid X receptor (*RXR*). Upon activation by ligand-binding, the complex binds to direct repeats that are separated by four nucleotides (DR4-elements) within the *ABCA1* promoter region and the first intron, enhancing *ABCA1*

**Fabiana DV Gervigir*,
Mario H Hirata &
Rosario DC Hirata**
Author for correspondence:
Department of Clinical &
Toxicological Analysis,
School of Pharmaceutical
Sciences, University of
São Paulo, Avenue Professor
Lineu Prestes, 580, B.17,
05508-900, São Paulo, Brazil
Tel.: +55 113 091 3660;
Fax: +55 113 813 2197;
fabidalla@usp.br

future
medicine part of fsg

transcription [24–26]. More specifically, neither cholesteryl esters nor free cholesterol can act as ligands for LXRs, and conversion to oxysterols, oxygenated derivatives of cholesterol, is required [24].

As in other genes, common variants in the *ABCA1* promoter may also potentially alter gene transcription. Kyriakou *et al.* [27] observed that the -565C>T polymorphism (also designated as -477C>T), which has been demonstrated to be associated with severe coronary atherosclerosis [28], has an allele-specific effect on *ABCA1* mRNA expression in human atherosclerotic plaques. Hodoglil *et al.* also verified an allele-specific effect on *ABCA1* promoter activity in cell models when they studied another variant, -14C>T (also designated as 69C>T) [29]. However, the relationship between the -14C>T polymorphism and the atherogenic lipid profile or risk of coronary disease has not always been consistently observed in several studies [29–32].

Besides sterols and genetic variants, natural and synthetic substances and metabolic regulators, such as hormones, cytokines and drugs, are also effective in modulating *ABCA1* expression [25].

Statins are widely used in lipid-lowering therapy. They inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis, resulting in increased LDL receptor density that increases the LDL uptake by hepatic and peripheral cells, reducing cholesterolemia [33].

Many previous data have demonstrated the efficacy, safety and clinical benefits (such as reduction of the risk of coronary events) of HMG-CoA reductase inhibitors [34–37]. These benefits are attributed not only to the lipid-lowering response but also to pleiotropic effects of the statins [38].

By blocking the mevalonate pathway and depleting cells of cholesterol and numerous metabolites involved in different cell functions, statins are able to modify the transcription and expression of several proteins, including *ABCA1*.

Effects of statins on *ABCA1* expression *in vitro*

Recently, reports have evaluated the effects of statins on *ABCA1* mRNA and protein expression and activity *in vitro*. Macrophage and liver cells are the most studied models. Whereas hepatic *ABCA1* contributes to overall plasma HDL concentrations [39], the macrophage *ABCA1* may be important for the prevention of atherosclerosis [40,41].

Until now, it has not been possible to draw conclusions regarding the effect of statins on *ABCA1* modulation in hepatic cells. Treatment of Fu5AH rat hepatoma cells with pitavastatin and compactin, the archetypal statin, resulted in an improvement of *ABCA1*-mediated lipid efflux [42]. Fluvastatin and pitavastatin have been reported to increase *ABCA1* mRNA levels in HepG2 human hepatoma cells [43,44]. Nevertheless, Ando *et al.* demonstrated that pravastatin did not modify the *ABCA1* mRNA and protein levels in HepG2 cells [45]. Likewise, the treatment of rat hepatoma McARH7777 cells with compactin did not affect the total *ABCA1* mRNA and protein levels [46]. However, the authors also observed that in Rat2 fibroblasts, this treatment reduced *Abca1* expression and it was demonstrated that two major *ABCA1* transcripts are able to modulate these different effects of compactin on liver and peripheral tissue.

In the murine and human macrophages (RAW264.7, murine primary peritoneal macrophage, THP-1 and human monocyte-derived macrophages), statins downregulated *ABCA1* expression. This effect was found after treatment with fluvastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin and compactin in a concentration- and time-dependent fashion [43,45,47,48]. Moreover, treatment with statins was also associated with decrease in *ABCA1* protein and in *ABCA1*-mediated cholesterol efflux in human macrophages [47–49]. In contrast, Argmann *et al.* reported that atorvastatin stimulated *ABCA1* mRNA expression and activity in THP-1 macrophages [50].

Despite the controversial findings, more recent studies have suggested that, actually, statins downregulate the *ABCA1* expression and *ABCA1*-mediated efflux in macrophages [48,49]. The mechanism of this effect seems to be the inhibition of cholesterol biosynthesis by statins with the inhibition of oxysterol biosynthesis, a ligand of LXR, resulting in lower expression of LXR target genes, such as *ABCA1* [48,49,51].

Effects of atorvastatin on *ABCA1* expression *in vivo*

In vivo effects of statins on *ABCA1* expression have been conflicting. *ABCA1* mRNA and protein levels in mice liver and leukocytes were not modified by pravastatin [45]. Nevertheless, treatment with pravastatin associated with a bile acid-binding resin (colestimide) caused an increase in total *Abca1* mRNA expression in rat liver [46].

Treatment with fluvastatin (20 mg/day) or atorvastatin (80 mg/day) 4 weeks prior to surgery did not influence liver *ABCA1* levels in normocholesterolemic patients with uncomplicated gallstone disease [52]. On the other hand, simvastatin (5–10 mg/day) increased *ABCA1* mRNA expression in the mononuclear cells of individuals with Type 2 diabetes [53].

We recently evaluated whether atorvastatin treatment (10 mg/day/4weeks) influences mRNA expression of *ABCA1* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). A total of 48 hypercholesterolemic (HC) and 50 normolipidemic (NL) individuals were selected from a cohort that was previously reported [54]. The study protocol is briefly described in the SUPPLEMENTARY MATERIAL section.

Anthropometric, demographic and clinical results of the studied groups are shown in TABLE 1. Concentrations of basal serum lipids were higher in HC than in NL individuals ($p < 0.001$), with the exception of HDL-C and ApoA1 which were not significantly different between these two groups.

The baseline expression of *ABCA1* did not differ between NL and HC individuals (FIGURE 1) and no correlation was observed between baseline *ABCA1* mRNA expression in PBMCs, serum HDL-C and ApoA1 or other lipids.

The lack of correlation between *ABCA1* mRNA expression and basal serum ApoA1 (the major protein of HDL) was expected as long as nascent HDL particles originate as lipid-free

or lipid-poor apolipoproteins, predominantly from the liver and intestine [3]. Moreover, Haghpassand *et al.* demonstrated that the selective inactivation of *ABCA1* in macrophages had little or no effect on the plasma concentration of HDL [40].

We firstly describe the effect of atorvastatin on *ABCA1* mRNA levels in PBMCs of HC individuals without other concomitant diseases. After treatment, the mean value of the *ABCA1* level was reduced by 21% ($p < 0.001$) (FIGURE 1) but no significant correlation between *ABCA1* expression, serum HDL-C and ApoA1 or other lipids was observed. Atorvastatin also reduced serum LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-C, triglycerides and apolipoprotein B (ApoB) levels, but not ApoA1, in the HC group (FIGURES 2A & 2B).

The inhibitory effect of atorvastatin on *ABCA1* transcription in PBMCs is similar to that found *in vitro* in human macrophages [43,45,47,48] and in THP-1 human monocytes during their differentiation into macrophages [55]. It is known that *ABCA1* is upregulated during human monocyte differentiation [23,56] and the extent of macrophage differentiation appears to be an important determinant for the relative potency of the statin-mediated downregulation of *ABCA1* [49]. Although this downregulatory effect seems to be an adverse effect of the statins on RCT, further investigations are necessary to determine the relevance of this observation.

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

Variables	NL (50)	HC (48)	p-value
Age (years)	45 ± 6	53 ± 9	<0.001
BMI (kg/m ²)	25 ± 3	26 ± 2	0.012
Systolic blood pressure (mmHg)	114 ± 12	122 ± 18	0.009
Diastolic blood pressure (mmHg)	70 ± 8	80 ± 15	<0.001
Gender (male/female) (%)	24/76	40/60	0.150
Menopause (%)	26	59	0.016
Smoking (%)	24	23	0.911
Physical activity (%)	42	48	0.700
Family history of CAD (%)	34	54	0.071
Basal serum lipids			
TC (mmol/l)	4.52 ± 0.45	7.02 ± 0.81	<0.001
TG (mmol/l)	0.84 ± 0.29	1.60 ± 0.64	<0.001
HDL-C (mmol/l)	1.51 ± 0.29	1.55 ± 0.37	0.878
LDL-C (mmol/l)	2.63 ± 0.45	4.72 ± 0.67	<0.001
ApoA1 (g/l)	1.44 ± 0.26	1.46 ± 0.28	0.639
ApoB (g/l)	0.89 ± 0.22	1.42 ± 0.32	<0.001

Number of individuals in parenthesis. Categorical variables were compared by χ^2 test. Continuous variables are presented as mean ± standard deviation and were compared by Mann-Whitney rank sum test or t-test.

ApoB: Apolipoprotein B; ApoA1: Apolipoprotein A-1; CAD: Coronary artery disease; HC: Hypercholesterolemic (patients); HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; NL: Normolipidemic (patients); TC: Total cholesterol; TG: Triglycerides.

Figure 1. ABCA1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of normolipidemic and hypercholesterolemic individuals. The HC group was treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) and mRNA expression was analyzed before (basal) and after treatment (atorvastatin). ABCA1 expression was measured by real-time PCR and normalized with UBC. $p < 0.001$ as indicated by Wilcoxon Signed Rank Test. HC: Hypercholesterolemic; NL: Normolipidemic; UBC: Ubiquitin C.

We did not evaluate ABCA1 protein expression in PBMCs. Wellington *et al.* demonstrated discordance between ABCA1 mRNA and protein levels in some mouse tissues, suggesting that ABCA1 may be regulated post-transcriptionally in selected cells or tissues [57]. Other studies have suggested that a variety of factors influence the cell content and activity of ABCA1

protein and thus, mRNA levels may not truly reflect the actual activity of the ABCA1 pathway *in vivo* [58].

Therefore, although statin-mediated reduction in ABCA1 mRNA levels also caused a reduction in ABCA1 protein levels and activity in human macrophages [47–49], we are not able to state, without further investigation, whether this same correlation occurs in PBMCs.

Interestingly, studies have demonstrated that in cholesterol-loaded macrophages, which are more relevant to atherogenesis, the inhibitory activity of statins, compared with nonloaded cells, on ABCA1 is lost [47,49]. Llaverias *et al.* also observed that ABCA1 mRNA and protein expression was not affected by atorvastatin exposure, in comparison with macrophages treated with acetyl-LDL alone [59].

According to Zanotti *et al.* [60], these observations suggest that the downregulatory effect on ABCA1 expression in nonfoamy cells will not negatively influence the anti-atherogenic effects of statins.

Effects of the ABCA1 promoter variant on mRNA expression *in vivo*: peripheral blood mononuclear cells

We also examined whether the SNP ABCA1 -14C>T may potentially alter gene expression in PBMCs before or after statin therapy. We have previously reported the -14T allele frequencies in these NL (33.6%) and HC (35.0%) individuals [54].

HC individuals carrying the -14CT/TT genotype demonstrated higher ABCA1 mRNA levels than the -14CC carriers ($p = 0.034$) (FIGURE 3).

Figure 2. Serum lipids (A) and apolipoproteins (B) in hypercholesterolemic individuals (n = 48), before (basal) and after atorvastatin treatment (atorvastatin). The values are means $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$ as indicated by paired *t*-test or Wilcoxon Signed Rank Test. ApoAI: Apolipoprotein AI; ApoB: Apolipoprotein B; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; TG: Triglycerides.

This result suggests that, in HC individuals, the -14C>T variant may affect the transcriptional activity of the gene. Hodoglugil *et al.* observed that in a reporter gene assay, the promoter containing the -14T allele displayed higher activity than the -14C allele in COS-7, Chinese hamster ovary (CHO) and HepG2 cells [29].

The relationship between the -14C>T variant and increased *ABCA1* mRNA expression in PBMCs was not found in either the NL group or the HC atorvastatin-treated individuals (Figure 3). In Dutch men, an association was observed between the progression of atherosclerosis and the -14C>T variant in the placebo group, but not in the group treated with pravastatin [30]. The authors suggested that statin therapy may be able to overcome the effects of this variant.

Interestingly, although we [54], and other authors [30,31], found no relationship between the SNP *ABCA1* -14C>T and serum lipids, the -14T allele was associated with higher serum HDL-C in Turkish and healthy Chinese men [29,31]. The mechanism underlying the changes caused by this polymorphism is still unclear. A study in mice that were selectively deficient in leukocyte *ABCA1* demonstrated that leukocyte *ABCA1* plays a critical role in the protection against atherosclerosis, and the authors suggested that other mechanisms, operating independently of plasma HDL, may account for this effect [61].

Conclusion & future perspective

Current knowledge regarding the impact of statin treatment on *ABCA1* expression is incomplete. We evaluated the mRNA expression of *ABCA1* in PBMCs since these cells are easily accessible. Although the effects of statins on *ABCA1* transcription in PBMCs of HC individuals and in nonloaded human macrophages *in vitro* are similar, they seem to differ from the effects observed in cholesterol-loaded macrophages. Therefore, further studies are needed to evaluate how relevant these findings are to the formation of arterial foam cells *in vivo*.

Our observations that the SNP *ABCA1* -14C>T is associated with high baseline gene expression in PBMCs of HC individuals, and also in cell models *in vitro* [29], are interesting. However, additional studies carried out with larger samples are necessary to reveal whether this effect is able to modulate the coronary artery disease risk in different populations.

Acknowledgements

The authors thank Cristina M Fajardo, Simone S Arazi, Maria Alice V Willrich, Alice C Rodrigues, Raquel de Oliveira, Claudia Villazon, Nadia Preto Godoy, Verônica Simões de Oliveira and Helder Honorato Basques for their technical support. FDV Genvigir is a recipient of fellowship from FAPESP (FAPESP

Figure 3. Effects of *ABCA1* -14C>T polymorphism on gene expression in peripheral blood mononuclear cells of normolipidemic and hypercholesterolemic individuals. HC group was treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) and mRNA expression was analyzed before (basal) and after treatment (atorvastatin). *ABCA1* expression was measured by real-time PCR and normalized with *UBC*. P-values were indicated by Mann-Whitney Rank Sum Test. HC: Hypercholesterolemic; NL: Normolipidemic; *UBC*: Ubiquitin C.

Executive summary

Background

- The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mediates the transport of cholesterol, phospholipids and other lipophilic molecules across cellular membranes, where they are removed from cells by lipid-poor high-density lipoprotein apolipoproteins.
- Mainly in the liver and small intestine, ABCA1 contributes to overall plasma high-density lipoprotein concentrations.
- Macrophage ABCA1 may be important for the prevention of atherosclerosis.

ABCA1 mRNA expression

- The transcriptional regulation of *ABCA1* is complex and several substances, such as statins, or even gene variants are able to modulate *ABCA1* expression.
- Statins are a class of medication widely used in lipid-lowering therapy. They act as competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis.
- Common variants in the *ABCA1* promoter have been associated with an allele-specific effect on *ABCA1* expression.
- Hypercholesterolemic individuals carrying the *ABCA1* -14CT+TT genotype had higher *ABCA1* mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells than the -14CC genotype carriers.

Effect of statins on ABCA1 expression

- There is strong evidence that statin treatment downregulates *ABCA1* expression in macrophages, but the effects of statins in liver cells remain to be confirmed.
- Atorvastatin also reduced *ABCA1* mRNA expression in the peripheral blood mononuclear cells of individuals with hypercholesterolemia.
- Studies have demonstrated that in cholesterol-loaded macrophages, which are more relevant to atherogenesis, the inhibitory activity of statins compared with nonloaded cells on *ABCA1* is lost.

Conclusion

- Additional studies carried out with larger samples are necessary to reveal whether the effect of the -14C>T polymorphism on *ABCA1* expression is able to modulate the coronary artery disease risk in different populations.
- Although the downregulatory effect of atorvastatin on mRNA expression of *ABCA1* in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals seems to be an adverse effect of the statins on reverse cholesterol transport, further investigations are necessary to determine the relevance of this observation.

2007/00398–3). Sao Paulo, SP, Brazil. MH Hirata and RDC Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brazil.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a

financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

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

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Tall AR: Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J. Intern. Med.* 263(3), 256–273 (2008).
- 2 Hersberger M, von Eckardstein A: Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 63(18), 1907–1945 (2003).
- 3 Krimbou L, Marcil M, Genest J: New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 17(3), 258–267 (2006).
- 4 Cavigiolio G, Shao B, Geier EG, Ren G, Heinecke JW, Oda MN: The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* 47(16), 4770–4779 (2008).
- 5 Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E *et al.*: Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of ApoA-I. *J. Clin. Invest.* 115(5), 1333–1342 (2005).
- 6 Francone OL, Subbiah PV, van Tol A, Royer L, Haghighat M: Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking Abca1. *Biochemistry* 42(28), 8569–8578 (2003).
- 7 Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Palomer X, Ribas V, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC: Direct evidence *in vivo* of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1738(1–3), 6–9 (2005).
- 8 Oram JF, Heinecke JW: ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 85(4), 1343–1372 (2005).
- 9 Lee JY, Parks JS: ATP-binding cassette transporter A1 and its role in HDL formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 16(1), 19–25 (2005).
- 10 Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J *et al.*: Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 116(4), 1052–1062 (2006).
- 11 Nofer JR, Remaley AT: Tangier disease: still more questions than answers. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(19–20), 2150–2160 (2005).
- 12 Bodzioch M, Orsós E, Klucken J *et al.*: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22(4), 347–351 (1999).

- 13 Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM *et al.*: Mutations in *ABCI* in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22(4), 336–345 (1999).
- 14 Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM *et al.*: Mutations in the *ABCI* gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354(9187), 1341–1346 (1999).
- 15 Rust S, Rosier M, Funke H *et al.*: Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22(4), 352–355 (1999).
- 16 Orsó E, Broccardo C, Kaminski WE *et al.*: Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abcl-deficient mice. *Nat. Genet.* 24(2), 192–196 (2000).
- 17 McNeish J, Aiello RJ, Guyot D *et al.*: High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(8), 4245–4250 (2000).
- 18 Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S: Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(6), 965–971 (2003).
- 19 Vaisman BL, Lambert G, Amar M *et al.*: ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 108(2), 303–309 (2001).
- 20 Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42(7), 1007–1017 (2001).
- 21 Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C *et al.*: Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(14), 7987–7992 (2000).
- 22 Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G: Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21(1), 150–159 (1994).
- 23 Kielar D, Dietmaier W, Langmann T *et al.*: Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin. Chem.* 47(12), 2089–2097 (2001).
- 24 Wójcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J: Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 61, 736–759 (2007).
- 25 Schmitz G, Langmann T: Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1735(1), 1–19 (2005).
- 26 Singaraja RR, Bocher V, James ER *et al.*: Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J. Biol. Chem.* 276(36), 33969–33979 (2001).
- 27 Kyriakou T, Hodgkinson C, Pontefract DE *et al.*: Genotypic effect of the -565C>T polymorphism in the ABCA1 gene promoter on ABCA1 expression and severity of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(2), 418–423 (2005).
- 28 Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto AM Jr, Marian AJ: Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ. Res.* 88(9), 969–973 (2001).
- 29 Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW: Common polymorphisms of ATP binding cassette transporter A1, including a functional promoter polymorphism, associated with plasma high density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Atherosclerosis* 183(2), 199–212 (2005).
- 30 Zwarts KY, Clee SM, Zwinderman AH *et al.*: ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. *Clin. Genet.* 61(2), 115–125 (2002).
- 31 Tan JH, Low PS, Tan YS *et al.*: ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum. Genet.* 113(2), 106–117 (2003).
- 32 Porchay-Baldérelli I, Péan F, Emery N *et al.*: Relationships between common polymorphisms of adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 and high-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in a population with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 58(1), 74–79 (2009).
- 33 Vaughan CJ, Gotto AM Jr: Update on statins: 2003. *Circulation* 110(7), 886–892 (2004).
- 34 Gotto AM Jr: Review of primary and secondary prevention trials with lovastatin, pravastatin, and simvastatin. *Am. J. Cardiol.* 96(5A), 34F–38F (2005).
- 35 Grundy SM, Cleeman JJ, Merz CN *et al.*: Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44(3), 720–732 (2004).
- 36 Kapur NK, Musunuru K: Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc. Health Risk Manag.* 4(2), 341–353 (2008).
- 37 LaRosa JC, He J, Vupputuri S: Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 282(24), 2340–2346 (1999).
- 38 Wang CY, Liu PY, Liao JK: Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol. Med.* 14(1), 37–44 (2008).
- 39 Basso F, Freeman L, Knapper CL *et al.*: Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J. Lipid Res.* 44(2), 296–302 (2003).
- 40 Haghpassand M, Bourassa PA, Franccone OL, Aiello RJ: Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J. Clin. Invest.* 108(9), 1315–1320 (2001).
- 41 Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA *et al.*: Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22(4), 630–637 (2002).
- 42 Zanotti I, Favari E, Sposito AC, Rothblat GH, Bernini F: Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(3), 670–674 (2004).
- 43 Sone H, Shimano H, Shu M *et al.*: Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316(3), 790–794 (2004).
- 44 Maejima T, Yamazaki H, Aoki T *et al.*: Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(2), 835–839 (2004).
- 45 Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A: Effects of pravastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(1), 420–425 (2004).

- 46 Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T *et al.*: Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J. Biol. Chem.* 282(29), 21090–21099 (2007).
- 47 Wong J, Quinn CM, Brown AJ: Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver X receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24(12), 2365–2371 (2004).
- 48 Qiu G, Hill JS: Atorvastatin inhibits ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1 macrophages by an LXR-dependent pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51(4), 388–395 (2008).
- Provides evidence that atorvastatin's effect on *ABCA1* expression in noncholesterol-loaded macrophages is mediated through a liver X receptor (LXR)-but not a Rho-dependent pathway.
- 49 Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Jessup W, Brown AJ: The effect of statins on *ABCA1* and *ABCG1* expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. *Atherosclerosis* 196(1), 180–189 (2008).
- Important paper that reconciles controversial findings about the effect of statins on transcription of *ABCA1*.
- 50 Arghmann CA, Edwards JY, Sawyez CG *et al.*: Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 280(23), 22212–22221 (2005).
- 51 Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ: Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283(2), 700–707 (2008).
- 52 Parini P, Gustafsson U, Davis MA *et al.*: Cholesterol synthesis inhibition elicits an integrated molecular response in human livers including decreased ACAT2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(6), 1200–1206 (2008).
- 53 Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H *et al.*: HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves reverse cholesterol transport in Type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *J. Atheroscler. Thromb.* 15(1), 20–25 (2008).
- 54 Genvigir FD, Soares SA, Hirata MH *et al.*: Effects of *ABCA1* SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. *Clin. Chim. Acta* 389(1–2), 79–86 (2008).
- 55 Llaverias G, Rebollo A, Pou J *et al.*: Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem. Pharmacol.* 71(5), 605–614 (2006).
- 56 Langmann T, Liebisch G, Moehle C *et al.*: Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1740(2), 155–161 (2005).
- 57 Wellington CL, Walker EK, Suarez A *et al.*: *ABCA1* mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Invest.* 82(3), 273–283 (2002).
- 58 Oram JF, Vaughan AM: ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 99(10), 1031–1043 (2006).
- 59 Llaverias G, Lacasa D, Vifials M *et al.*: Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem. Pharmacol.* 68(1), 155–163 (2004).
- 60 Zanotti I, Poti F, Favari E, Steffensen KR, Gustafsson JA, Bernini F: Pitavastatin effect on ATP binding cassette A1-mediated lipid efflux from macrophages: evidence for liver X receptor (LXR)-dependent and LXR-independent mechanisms of activation by cAMP. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317(1), 395–401 (2006).
- 61 van Eck M, Bos IS, Kaminski WE *et al.*: Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(9), 6298–6303 (2002).
- 62 World Health Organization: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 894(i–xii), 1–253 (2000).
- 63 Rebecchi IM, Rodrigues AC, Arazi SS *et al.*: *ABCB1* and *ABCC1* expression in peripheral mononuclear cells is influenced by gene polymorphisms and atorvastatin treatment. *Biochem. Pharmacol.* 77(1), 66–75 (2009).
- 64 Arazi SS, Genvigir FD, Willrich MA *et al.*: Atorvastatin effects on *SREBF1a* and *SCAP* gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. *Clin. Chim. Acta* 393(2), 119–124 (2008).
- 65 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.*: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7), RESEARCH0034 (2002).
- 66 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25(4), 402–408 (2001).

■ Website

- 101 GeNorm normalization of real-time PCR expression data
<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

Supplementary Material: materials & methods

The characteristics of the study design have been previously reported [54]. In addition, new exclusion criteria were adopted: subjects with obesity (BMI > 30 kg/m² [62]) or who were undergoing treatment with other medicines (with the exception of antihypertensive drugs) were excluded from the study.

Blood samples for biochemical profile measurements (serum lipids, alanine aminotransferase and creatine kinase) and mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells were collected after a 12 h fasting. For hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin (10 mg/day), blood samples were collected before and after the 4 weeks of treatment. Peripheral blood mononuclear cells were isolated as previously described [63].

Genomic DNA was extracted from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated whole blood samples using a salting-out method and the *ABCA1* -14C>T SNP was detected by PCR and restriction fragment length polymorphism assays as previously reported [54].

Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using TRIzol® Reagent (Invitrogen-Life Technologies [CA, USA]) following the manufacturer's suggested protocol. cDNA was produced from 1 µg of total RNA

by Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen-Life Technologies) and the *ABCA1* mRNA level was measured by TaqMan® quantitative PCR using ubiquitin C (*UBC*) as reference gene. Among four reference genes tested, *UBC* was chosen as the most stable according to the analysis by GeNorm software [101]. The quantitative PCR assays were carried out in 96-well plates using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems [CA, USA]). The thermal cycler protocol was previously described [64]. All cDNA samples were assayed in duplicate, and target gene and *UBC* were assayed on the same samples in separate tubes.

The primer and probe sequences used for quantitative PCR for human *ABCA1* were: forward primer, 5'-GCTGCATAG-TCTTGGGACTCT-3'; reverse primer, 5'-CGCATGTCACTCCAGCTTCT-3'; and probe, 5'-FAM ATGCTGAACAGCTCCTG MGB-NFQ-3'. Primer sequences for the human *UBC* were used as described by Vandesompele *et al.* [65] and the human *UBC* probe was 5'-VIC TCGTCACTTGACAATGC MGB-NFQ-3'.

The relative quantification value of the *ABCA1* expression was analyzed using a comparative C_T method [66]. Calibrator was not used, so the formula was 2^{-ΔCT}.

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

Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells

Aims: The ATP-binding cassette transporters, ABCA1 and ABCG1, are LXR-target genes that play an important role in reverse cholesterol transport. We examined the effects of inhibitors of the cholesterol absorption (ezetimibe) and synthesis (statins) on expression of these transporters in HepG2 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of individuals with primary (and nonfamilial) hypercholesterolemia (HC). **Materials & methods:** A total of 48 HC individuals were treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) and 23 were treated with ezetimibe (10 mg/day/4 weeks), followed by simvastatin (10 mg/day/8 weeks) and simvastatin plus ezetimibe (10 mg of each/day/4 weeks). Gene expression was examined in statin- or ezetimibe-treated and control HepG2 cells as well as PBMCs using real-time PCR. **Results:** In PBMCs, statins and ezetimibe downregulated ABCA1 and ABCG1 mRNA expression but did not modulate NR1H2 (LXR- β) and NR1H3 (LXR- α) levels. Positive correlations of ABCA1 with ABCG1 and of NR1H2 with NR1H3 expressions were found in all phases of the treatments. In HepG2 cells, ABCA1 mRNA levels remained unaltered while ABCG1 expression was increased by statin (1.0–10.0 μ M) or ezetimibe (5.0 μ M) treatments. Atorvastatin upregulated NR1H2 and NR1H3 only at 10.0 μ M, meanwhile ezetimibe (1.0–5.0 μ M) downregulated NR1H2 but did not change NR1H3 expression. **Conclusion:** Our findings reveal that lipid-lowering drugs downregulate ABCA1 and ABCG1 mRNA expression in PBMCs of HC individuals and exhibit differential effects on HepG2 cells. Moreover, they indicate that the ABCA1 and ABCG1 transcript levels were not correlated directly to LXR mRNA expression in both cell models treated with lipid-lowering drugs.

KEYWORDS: ABCA1 ABCG1 ezetimibe mRNA expression PBMC statins

The efficacy of the inhibitors of cholesterol biosynthesis, such as statins, in reducing low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and cardiovascular events is well established [1,2]. However, despite intensive therapy to lower LDL-C levels, the annual risk of a major cardiovascular event in patients with established coronary artery disease remains around 9% [3]. In an attempt to reduce this residual risk, investigators are focusing on the cardiovascular benefits of increasing the high-density lipoprotein (HDL) and stimulating the reverse cholesterol transport system (RCT). In the RCT, HDL mobilizes excess free cholesterol and other lipids from peripheral tissues and delivers them to the liver and steroidogenic organs [4]. Studies have described that ABCA1 and ABCG1, two members of ABC family, play important roles in this RCT pathway [5]. In the liver, ABCA1 is primarily responsible for the initiation of HDL formation [6,7] while the biological function of ABCG1 is not well defined [8]. In addition, in macrophages, ABCA1 promotes net cholesterol efflux to lipid-poor apolipoprotein AI (apoA-I) and ABCG1 facilitates net cholesterol efflux to HDL particles [9].

ABCA1 and ABCG1 have been recognized as sterol-sensitive genes in macrophages. Natural and synthetic lipids have been characterized as the most effective transcriptional modulators of these genes and their inductive effects are mainly regulated by the nuclear receptors LXR- α and - β [10].

As long as the statins inhibit the intracellular cholesterol synthesis, they are able to modulate these sterol-sensitive genes. Until now, *in vitro* effects of statins on ABCA1 and ABCG1 expression have been more established in monocytes and macrophages [11–16]. Conversely, there are few and conflicting studies describing the effects of statins on these genes in hepatic cells or *in vivo* approaches.

We previously reported results on the inhibitory effect of atorvastatin on ABCA1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [17]. However, the effect of statins on ABCG1 transcription in PBMCs *in vivo* still remains to be elucidated.

The present study describes the influence of the two statins (atorvastatin and simvastatin) and the inhibitor of cholesterol absorption (ezetimibe) on mRNA expression of ABCA1

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir¹, Alice Cristina Rodrigues¹, Alvaro Cerda¹, Simone Sorkin Azaiz¹, Maria Alice Vieira Willich¹, Raquel Oliveira¹, Mario Hiroyuki Hirata¹, Egidio Lima Dorea², Márcia Martins Bernik², Rui Curi³ & Rosário Dominguez Crespo Hirata¹

¹Department of Clinical & Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ²University Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ³Department of Physiology & Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Author for correspondence: Tel: +55 11 3 091 3660; Fax: +55 11 3 813 2197; fab-dalla@usp.br

future medicine part of fsg

and ABCG1 in PBMCs of hypercholesterolemic individuals. As the LXRs are potential mediators of their transcription, NR1H2 (LXR- β) and NR1H3 (LXR- α) levels also were evaluated. Moreover, we examined whether *ABCA1* and *ABCG1* expression in statin- or ezetimibe-treated human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells differs from the expression in PBMCs. Although the *ABCA1* levels were already evaluated in HepG2 cells treated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, conflicting results were reported by other studies [13,15,18].

Materials & methods

Subjects & study protocols

A total of 71 unrelated Brazilian individuals (25 men and 46 women) with primary (and nonfamilial) hypercholesterolemia (HC), which was not associated with intake of drugs and disease states [19], and with increased serum LDL-C levels (>4.14 mmol/l) after a wash-out period of four weeks on a low-fat diet, as previously described [20], were selected at the University Hospital of the Sao Paulo University (Sao Paulo, Brazil). Subjects with thyroid, liver or renal disease, diabetes, increased serum concentrations of triglycerides (>4.52 mmol/l), pregnant women or those taking oral contraceptives or hormone replacement therapy or other causes of secondary dyslipidemia were not included in the study.

The selected individuals were treated with cholesterol-lowering drugs. One group was treated with 10 mg atorvastatin orally once daily for 4 weeks (HC-atorvastatin [AT], $n = 48$). The other group, HC-simvastatin + ezetimibe (SE) ($n = 23$) was treated with ezetimibe (10 mg/day/orally/4 weeks), followed by treatment with simvastatin (10 mg/day/orally/8 weeks) and afterwards by a combined therapy (simvastatin plus ezetimibe) for 4 more weeks. Before and after each treatment, all patients were evaluated for serum concentrations of lipids, alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CK). ALT and CK were determined in order to detect possible adverse drug reactions.

Information on age, height and weight, medication use, cigarette smoking, alcohol consumption, physical activity, as well as history of menopause, hypertension, obesity and family history of coronary artery disease (CAD) was recorded. Current cigarette smoking was defined as a daily intake of one or more cigarette. We considered alcohol consumption as a daily intake of beer, wine or distilled spirits of

1 g/day or more. Physical activity was considered the practice of sports, for example walking, running or swimming, for at least 2 h per week.

Anthropometric measurements, such as BMI, were taken from each participant. Subjects with a BMI of 30 kg/m^2 or more were classified as obese [21]. Individuals with systolic/diastolic blood pressure of 140/90 mmHg or more, or under antihypertensive therapy were considered hypertensive [22].

The study protocols were approved by the ethics committees of the University Hospital and the School of Pharmaceutical Sciences of the University of Sao Paulo, Brazil and informed consent was obtained from each participant.

Blood samples & isolation of PBMCs

Blood samples for biochemical profile measurements and mRNA expression in mononuclear cells were collected from the patients treated with lipid-lowering drugs before and after the treatment period, after a 12 h fast. PBMCs were isolated from ethylenediaminetetraacetic acid-anticoagulated blood using Histopaque® (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) and immediately used for RNA extraction.

Biochemical profile

Total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C) and triglyceride serum concentrations were measured using standard enzymatic methods. Plasma apoA-I and apolipoprotein B (apoB) were determined by nefelometry. Value of LDL-C was estimated [23]. Serum ALT and CK tests were determined by kinetic methods using the ADVIA® 1650 analyzer (Bayer Diagnostics, NY, USA).

HepG2 cells, culture conditions & statin or ezetimibe treatments

HepG2 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate, 10,000 UI/ml streptomycin and 10,000 UI/ml penicillin. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere, containing 5% CO₂. Culture medium was replaced twice a week and cells were trypsinized and subcultured every 7 days.

HepG2 cells were treated with atorvastatin (kindly provided by Pfizer Pharmaceuticals Ltd., NY, USA), simvastatin (Sigma-Aldrich), as previously reported [24,25], or ezetimibe (kindly provided by Merck/Schering-Plough, NJ, USA). Briefly, atorvastatin and ezetimibe were

dissolved in methanol or ethanol respectively, while simvastatin was dissolved in ethanol and activated as described by Sadeghi *et al.* [26]. The final concentration of methanol or ethanol, in the culture medium did not exceed 0.1% and 0.2%, respectively.

For cytotoxicity assays, cells were incubated with atorvastatin (0.1–10.0 μM) or simvastatin (0.01–10.0 μM) for up to 72 h. Cytotoxicity of ezetimibe was based on results from the literature [27]. For mRNA expression measurements, HepG2 cells were seeded at 2.5×10^6 cells per 75 cm^2 , treated with atorvastatin (0–10 μM), simvastatin (0–10 μM) or ezetimibe (0–5 μM) for 6, 12 or 24 h. The maximum concentration of ezetimibe used in this study was a condition established by the pharmaceutical company that provided the pure drug.

■ mRNA expression by real-time PCR

Total RNA was extracted from PBMCs or HepG2 cells ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$) using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA) following the manufacturer's suggested protocol. RNA was dissolved in diethyl-pyrocabonate-treated water and the concentration of each sample was obtained from nucleic acid purity assessment using A260/A280 measurements. cDNA was produced from 1 (PBMCs) or 2 μg (HepG2 cells) of total RNA by Superscript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen-Life Technologies).

ABCA1, ABCG1, NRIH2 (LXR- β) and NRIH3 (LXR- α) mRNA levels were measured by TaqMan[®] quantitative PCR (qPCR) assay, using *UBC* or *GAPDH* as reference gene. In our experiments, among six reference genes tested, *UBC* and *GAPDH* were selected as the most stable for PBMCs and HepG2 cells, respectively, according to the analysis by GeNorm software[®] [28].

Primers and probes sequences used for ABCA1, *UBC* and *GAPDH* mRNA detection were previously described [17,25]. *ABCG1*, *NRIH2* and *NRIH3* were selected from 'Assay on demand' formats provided by Applied Biosystems-Life Technologies (CA, USA).

Quantitative PCR assays were carried out in 96 well plates using a 7500 Fast Real-Time PCR[®] system (Applied Biosystems-Life Technologies). The thermal cycler protocol consisted of two initial cycles at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All cDNA samples were assayed in duplicate and target and reference genes were assayed on the same samples in separate tubes. The relative quantification value

of each target gene was analyzed using a comparative CT method [29]. The following formulas were used to calculate the relative amount of the transcript in the sample: $2^{-\Delta\text{CT}}$ (PBMCs and baseline expression profile for HepG2 cells) or $2^{-\Delta\text{CT}}$ (HepG2 cells).

■ Statistical analysis

Data from HC individuals were reported as means $\pm$ standard error of the mean (SEM) or represented as median with interquartile range. Variables without normal distribution were not log transformed for analysis. To evaluate the serum lipid concentration or mRNA expression before and after treatments, nonparametric and paired data were analyzed by Wilcoxon signed rank test or Friedman Repeated Measures analysis of variance (ANOVA) on ranks (two or four sample, respectively). Parametric data were analyzed by one-way repeated measures ANOVA (four paired samples).

For HepG2 data, each set of experiments was repeated at least three-times in cells pertaining to different passages. Results are reported as means $\pm$ SEM. Differences among the means were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests comparing each treatment with control. Correlation of data was analyzed by Spearman's rank correlation coefficient (*rs*) test and, for this study, only an *rs* of 0.5 or more were considered.

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism[®] version 5.00 for Windows (GraphPad Software Inc., CA, USA) and SigmaStat[®] Software version 3.5 (Systat Software Inc., CA, USA). Significance level was set at a *p*-value of less than 0.05.

Results

■ Clinical & laboratory data of HC individuals

The demographic and clinical data of the HC individuals are summarized in TABLE 1. No significant variations between the characteristics of HC-AT and HC-SE groups were found (data not shown).

TABLE 2 shows the response of HC individuals to simvastatin and/or ezetimibe treatments. As expected, total cholesterol, LDL-C and apoB serum concentrations were gradually decreased after therapy with ezetimibe, simvastatin and simvastatin plus ezetimibe ($p < 0.05$). Only after treatment with simvastatin alone or combined with ezetimibe, triglyceride concentrations were significantly lower than baseline values. HDL-C and apoA-I were not modified by

Table 1. Characteristics of the hypercholesterolemic individuals.

Variables	
n	71
Age, years	54 ± 1
Male	35%
Female	65%
Arterial hypertension	45%
Obesity	6%
Menopausal women	70%
Cigarette smoking	22%
Alcohol consumption	27%
Physical activity	49%
Family history of CAD	56%

Age variable is presented as mean ± standard error of the mean. Individuals with BMI ≥30 kg/m² were classified as obese [21] and those with systolic/diastolic blood pressure of ≥140/90 mmHg or under antihypertensive therapy were considered hypertensive [22].
CAD: Coronary artery disease.

treatment with cholesterol-lowering drugs. As previously reported [17], treatment with atorvastatin reduced serum total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglyceride serum concentrations by an average of 28, 38, 4 and 12%, respectively.

There were no significant variations in muscular (CK) and hepatic (ALT) serum enzymatic activities in HC-SE (TABLE 2) or HC-AT (data not shown) patients treated with the cholesterol-lowering drugs.

■ Baseline expression profile

Baseline levels of ABCA1, ABCG1, NRIH2 and NRIH3 expression in both human cellular models are shown in FIGURE 1. In PBMCs of HC individuals, ABCG1 and NRIH2 were the most expressed transcripts, followed by ABCA1, which was two times higher than NRIH3. Nevertheless, in HepG2 cells, NRIH2 and NRIH3 were eight- and five-times more expressed than ABCG1. ABCA1 demonstrated lower expression in these cells. With respect to ABC transporters, ABCG1 level was 2.4- and 383.8-fold higher than ABCA1 in PBMCs and HepG2 cells, respectively.

■ Effects of cholesterol-lowering drugs on mRNA expression in PBMCs

In PBMCs of HC individuals, ABCA1 and ABCG1 mRNA expression were significantly downregulated by simvastatin and/or ezetimibe treatments (10 mg of each/day) (FIGURE 2). Moreover, transporter transcription levels after the combined therapy were lower than after ezetimibe treatment. Despite the statin therapy, only ABCG1 expression showed the same effect (FIGURE 2).

In the same way and as previously reported for ABCA1 [17], after treatment with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks), the ABCG1 level was also reduced in PBMCs ($p = 0.003$, FIGURE 3). On the contrary, NRIH2 and NRIH3 in PBMCs were not modulated by statin and/or ezetimibe treatments (data not shown).

■ Effects of cholesterol-lowering drugs on mRNA expression in HepG2 cells

Treatment of HepG2 cells with up to 10.0 µM atorvastatin or simvastatin for 24 h had no effect on cell viability or DNA fragmentation (data not shown). All cells had viability of 97% or more and the percentage of cells with fragmented DNA was less than 9%.

We next investigated the effects of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in HepG2 cells. As shown in FIGURE 4, statins increased ABCG1 mRNA expression in a time- and dose-dependent manner, but did not induce any change in ABCA1 mRNA levels in HepG2 cells. Atorvastatin increased ABCG1 transcript levels after 12 h at 1.0 (3.59 ± 0.50) and 10.0 µM (3.53 ± 0.50) compared with control (1.00 ± 0.08 , $p < 0.001$). After 24-h treatment, ABCG1 mRNA levels were significantly increased also to 1.0 (3.15 ± 0.46 vs 1.00 ± 0.15 , $p < 0.001$) and 10.0 µM (4.95 ± 0.68 vs 1.00 ± 0.15 , $p < 0.001$). Moreover, 10.0 µM atorvastatin treatment also induced the NRIH2 and NRIH3 transcription after 12 and 24 h ($p < 0.05$) (FIGURE 4).

Simvastatin only increased ABCG1 mRNA expression after 24-h treatment at 1.0 (2.11 ± 0.24) and 10.0 µM (2.28 ± 0.19) compared with control HepG2 cells (1.00 ± 0.11 , $p < 0.001$) (FIGURE 4).

Likewise, compared with the vehicle control, HepG2 cells treated with 5.0 µM of ezetimibe for 24 h resulted in a modest increase (1.3-fold) in the ABCG1 transcription level and did not alter ABCA1 mRNA expression (FIGURE 5). Furthermore, there was reduction in NRIH2 level, but not in NRIH3. This reduction in NRIH2 transcription was significant after 12-h treatment at 5.0 µM (0.71 ± 0.02) and also after 24-h treatment at 1.0 (0.80 ± 0.07), 2.5 (0.74 ± 0.04) and 5.0 µM (0.75 ± 0.03) compared with control (12 h: 1.00 ± 0.03 ; 24 h: 1.00 ± 0.11 , $p < 0.05$) (FIGURE 5).

■ Analysis of correlation

Significant correlations between mRNA baseline expression of ABCA1 and ABCG1 were found in PBMCs ($r_s = 0.841$, $p < 0.001$). After all treatments of HC individuals with

Table 2. Biochemical profile of hypercholesterolemic individuals in response to ezetimibe, simvastatin or combined treatment.

Parameter	Basal	Eze	Simva	Eze + Simva	p-value
LDL-C (mmol/l) [†]	4.69 ± 0.14	3.54 ± 0.14	3.16 ± 0.16	2.40 ± 0.17	<0.001
TC (mmol/l) [†]	7.01 ± 0.14	5.85 ± 0.17	5.36 ± 0.18	4.60 ± 0.18	<0.001
TG (mmol/l) [†]	1.65 ± 0.13	1.54 ± 0.15	1.39 ± 0.12	1.39 ± 0.13	0.009
HDL-C (mmol/l) [‡]	1.56 ± 0.06	1.61 ± 0.06	1.56 ± 0.07	1.56 ± 0.07	0.093
ApoA-I (g/l) [‡]	1.47 ± 0.05	1.47 ± 0.05	1.47 ± 0.06	1.52 ± 0.05	0.643
ApoB (g/l) [‡]	1.20 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.74 ± 0.05	<0.001
CK (U/l) [‡]	120.65 ± 11.59	121.48 ± 14.36	124.39 ± 13.49	115.18 ± 10.03	0.610
ALT (U/l) [‡]	22.87 ± 1.84	25.13 ± 2.41	22.74 ± 1.31	26.43 ± 2.23	0.260

Values are presented as mean ± standard error of the mean.

[†]Results were compared by one way repeated measures ANOVA and Holm-Sidak method for multiple comparisons.

[‡]Results were compared by Friedman repeated measures ANOVA on ranks.

ALT: Alanine aminotransferase; ANOVA: Analysis of variance; CK: Creatine kinase; Eze: Ezetimibe (10 mg/day/4 weeks); Eze + Simva: Ezetimibe plus simvastatin (10 mg/day/4 weeks); HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; Simva: Simvastatin (10 mg/day/8 weeks); TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride.

cholesterol-lowering drugs, the significant correlations between ABCA1 and ABCG1 mRNA levels were maintained (data not shown).

NR1H2 and NR1H3 mRNA expression in PBMCs were also positively correlated at baseline levels ($r_s = 0.681$, $p < 0.001$) and after the treatments evaluated (data not shown).

Correlation analyses between mRNA expression of all genes and serum lipid concentrations of HC individuals before and after the cholesterol-lowering treatments were performed, but no significant correlation was found (data not shown).

In HepG2 cells, correlations between ABCA1 and ABCG1 or between NR1H2 and NR1H3 levels were not statistically significant either before or after different concentrations and time of exposure to the statins (data not shown).

In both cell models, correlation between LXR mRNA expression and ABCA1 or ABCG1 was not found.

Discussion

The present study examined the effect of lipid-lowering drugs on ABCA1 and ABCG1 mRNA expression, which are involved in the metabolism of HDL [5]. We also investigated whether cholesterol-lowering treatments influence mRNA expression of NR1H2 and NR1H3. The studies were performed in HepG2 cells and in PBMCs of Brazilian hypercholesterolemic individuals treated with statins and/or ezetimibe.

The gene-expression analysis showed that ABCG1 was expressed 2.4- and 383.8-fold higher than ABCA1 in PBMCs and HepG2 cells, respectively. Corroborating with our

Figure 1. Baseline expression profile of the ABCA1, ABCG1, NR1H2 and NR1H3 genes in (A) peripheral blood mononuclear cells and (B) HepG2 cells. The mRNA expression of each gene was measured by real-time quantitative PCR and normalized with *UBC* (PBMCs) or *GAPDH* (HepG2 cells). Each symbol represents the average value of duplicate of each hypercholesterolemic individual analyzed ($n = 71$) or 21 experiments in HepG2 cells pertaining to different passages. The horizontal line shows the median of the data. The $2^{-\Delta CT}$ formula was used to calculate the relative amount of the transcript in the sample. Y-axis is presented on a logarithmic scale. PBMC: Peripheral blood mononuclear cell.

Figure 2. Relative expression of the (A) *ABCA1* and (B) *ABCG1* transporter genes in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals before and after lipid-lowering therapy. Real-time quantitative PCR was performed using total RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals before (basal) and after treatments. The mRNA expression of each transporter was normalized with *UBC*. Each symbol represents the average value of duplicate of each hypercholesterolemic individual analyzed ($n = 23$) and horizontal lines show the median with interquartile range. Y-axis is presented on a logarithmic scale. $p < 0.05$ as indicated by Friedman repeated measures analysis of variance on ranks followed by Student Newman-Keuls method. Eze: Ezetimibe (10 mg/day/4 weeks); Eze + Simva: Ezetimibe plus simvastatin (10 mg/day/4 weeks); Simva: Simvastatin (10 mg/day/8 weeks).

results, in peripheral blood monocytes of healthy or Type II diabetes mellitus individuals the *ABCG1* level was more abundant than *ABCA1* [30,31]. Moreover, as long as HepG2 is a cell line derived from the hepatocellular carcinoma, the large difference between baseline *ABCA1* and *ABCG1* expression observed

in our study is consistent with data reported by Moustafa *et al.* [32]. The authors demonstrated that in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma, compared with the nontumor region, the tumor region revealed higher expression of *ABCG1* and lower expression of *ABCA1*.

This study demonstrated that *NR1H2* is more expressed than *NR1H3* in PBMCs of HC individuals. Conversely, other authors reported reduced *NR1H2* expression in PBMCs of healthy donors [33]. This difference may be owing to the blood cholesterol status of the studied subjects. The reference gene used in qPCR assays may also contribute to the variability of the results among different studies. *GAPDH* is the commonly used reference gene, while we selected *UBC* as the most stable gene in the experimental conditions. It has been reported that different findings can result from different reference genes [34]. Therefore, the validation of the stability or expression of the constitutively expressed gene in response to experimental treatment is very important [28].

The treatment of HC individuals with atorvastatin and simvastatin downregulated *ABCA1* and *ABCG1* levels in PBMCs. On the contrary, pravastatin did not change the mRNA expression and protein *ABCA1* in leukocytes of mice [13] and simvastatin increased *ABCA1* levels in PBMCs of Type II diabetes patients *in vivo* [35]. However, differences

Figure 3. *ABCG1* mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals before and after atorvastatin therapy (10 mg/day/4 weeks). The group was treated with atorvastatin, and mRNA expression was analyzed before (basal) and after treatment (atorvastatin). *ABCG1* expression was measured by real-time quantitative PCR and normalized with *UBC*. Each symbol represents the average value of duplicate of each hypercholesterolemic individual analyzed ($n = 48$) and horizontal lines show the median with interquartile range. Y-axis is presented on a logarithmic scale. $p = 0.003$ as indicated by Wilcoxon signed rank test.

Figure 4. Effects of atorvastatin and simvastatin on mRNA expression levels of (A & B) *ABCA1*, (C & D) *ABCG1*, (E) *NR1H2* and (F) *NR1H3* in HepG2 cells. Real-time quantitative PCR was performed using total RNA extracted from 6, 12 and 24 h atorvastatin- or simvastatin-treated (0–10 μM) and vehicle control (0 μM) cells. Values are reported as mean ± standard error of the mean of four or five independent experiments and expressed as relative value to control. **p* < 0.05 and ****p* < 0.001 as compared with 0 μM statin as indicated by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post-tests.

between human and mice cholesterol metabolism and the absence of diabetic patients in our study may explain the different findings.

Other authors also reported the down-regulatory effect on *ABCA1* and *ABCG1* transcription in human and murine macrophages

treated *in vitro* with different statins [11–15]. Furthermore, statins also reduced the ABCA1 protein and cholesterol efflux mediated in these cells [11,12,14].

In macrophages, studies have supported the fact that statins downregulate *ABCA1* and *ABCG1* expression by limiting the availability of oxysterol ligands for LXRs [11,36]. LXRs belong to a family of nuclear receptors and act as cholesterol sensors in the body. Upon activation by ligand, LXRs form obligate heterodimers with the retinoid X receptor and the DNA binding domain of LXR interacts with LXR response elements in the promoter regions of the target genes, such as *ABCA1* and *ABCG1*, to initiate transcription [37].

Unlike the ABC transporters, *NR1H2* and *NR1H3* were not modulated by lipid-lowering treatments in PBMCs of HC patients. Guan *et al.* reported that *NR1H3* mRNA levels

were improved by simvastatin treatment compared with levels found in untreated diabetic groups [35]. In the murine leukocytes, pravastatin treatment also increased *Nr1h3* expression [13]. Nevertheless, as explained earlier, these studies evaluated diabetic patients or mice, which may explain the different findings. Corroborating with the findings of the statin effects on LXR activity in macrophages [11], our data indicate that the *ABCA1* and *ABCG1* downregulation by statins was not owing to direct alteration in LXR mRNA expressions in PBMCs. This effect on ABC transporter levels may be due to changes in the availability of oxysterols, and consequently in activity of LXRs, nevertheless other studies are needed to confirm this.

Interestingly, we also demonstrated the inhibitory effect of ezetimibe on the *ABCA1* and *ABCG1* expression in PBMCs. Thus, our results suggest that ezetimibe treatment

Figure 5. Effects of ezetimibe on mRNA expression levels of (A) *ABCA1*, (B) *ABCG1*, (C) *NR1H2* and (D) *NR1H3* in HepG2 cells. Real-time quantitative PCR was performed using total RNA extracted from 12 and 24 h ezetimibe-treated (0 to 5 μM) and vehicle control (0 μM) cells. Values are reported as mean ± standard error of the mean of three independent experiments and expressed as relative value to control.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with 0 μM ezetimibe as indicated by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post-tests.

10 mg/day/4 weeks) might decrease the availability of oxysterol ligands for LXR in PBMCs. However, studies are needed to confirm whether the effect of ezetimibe on these gene transcriptions is dependent or not on other metabolic pathways.

It has been shown that ezetimibe reduces Abca1 mRNA level in enterocytes of mice fed with basal diet (0.02% w/w cholesterol) [38]. Moreover, Seedorf *et al.* have shown that ezetimibe inhibited uptake of oxidized LDL in a dose-dependent manner in human macrophages and blocked the lipid-induced induction of *ABCA1* and *ABCG1* in oxidized LDL-loaded macrophages [39].

Consistent with this finding, studies have shown that in cholesterol-loaded macrophages, which are more relevant to atherogenesis, the inhibitory effect of statins on *ABCA1*, compared with nonloaded cells, is lost [11,14]. Therefore, further investigations are necessary to determine the clinical relevance of these downregulatory effects of the lipid-lowering drugs on *ABCA1* and *ABCG1* expression in PBMCs.

In all phases of the study, correlation analysis demonstrated that *ABCA1* and *ABCG1* appear to be coordinately regulated in PBMCs. Moustafa *et al.* also reported that both the gene-expression levels were closely correlated in peripheral blood leukocytes obtained from healthy volunteers or patients with hepatocellular carcinoma [32].

Unlike in PBMCs, in HepG2 cells statin or ezetimibe treatment caused different responses in *ABCA1* and *ABCG1* expression and their levels were not correlated. For *ABCA1*, different concentrations of atorvastatin, simvastatin or ezetimibe did not alter the gene transcription. On the contrary, treatment of Fu5AH rat hepatoma or HepG2 cells with statins increased the transcript levels or improved *ABCA1*-mediated lipid efflux [15,18,40]. Consistent with our results, hepatic Abca1 levels of mice fed with basal diet was not affected by ezetimibe treatment [38]. Other authors have not found changes in *ABCA1* mRNA and protein expression in HepG2 cells and in liver tissue of mice treated with statins [13]. Treatment with fluvastatin (20 mg/day) or atorvastatin (80 mg/day) for 4 weeks previous to surgery also did not modify *ABCA1* levels in liver biopsy samples from normocholesterolemic patients with uncomplicated gallstone disease [41].

Interestingly, in rats, Tamehiro *et al.* also reported that compactin (also called mevastatin) did not alter the total Abca1 level in hepatoma McARH7777 cells while in peripheral tissue (Rat2 fibroblasts) this treatment reduced the

Abca1 mRNA expression [42]. According to that study, two major *ABCA1* transcripts are able to modulate these different effects of compactin on liver and peripheral tissues. Peripheral tissues have a single major transcript, whose promoter is LXR-responsive element-dependent. Nevertheless, liver tissue also has another transcript, which is activated by HMG-CoA reductase inhibitors via the sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). SREBP-2 is a transcriptional factor that plays an important role in lipid metabolism and homeostasis, mainly by activation of cholesterol synthetic genes [43]. Thus hepatic *ABCA1* expression is counterbalanced by LXR- and SREBP-2 driven promoter. The same two transcripts were also dominant in the human liver, nonetheless other studies are needed to confirm whether these same modulations are applicable to human cells treated with statins.

Likewise in PBMCs, LXR mRNA expression was not correlated with *ABCA1* or *ABCG1* levels in untreated or lipid-lowering drug-treated HepG2 cells. In response to atorvastatin treatment, after 12 or 24 h (but not 6 h), *NR1H2* and *NR1H3* were upregulated only at 10.0 μ M. Ando *et al.* also found no difference in *NR1H3* (LXR α) mRNA expression in the HepG2 cells treated with 1.0 or 10.0 μ M pravastatin for 8 h [13]. Conversely, we found that ezetimibe treatment downregulated *NR1H2* transcription and did not alter *NR1H3* level. Similar to our study, During *et al.* also observed that *NR1H2* was significantly lower in human intestinal Caco-2 cells incubated with ezetimibe than in control cells and that *NR1H3* was not affected by this treatment [44]. Therefore, as well as in PBMCs, our results indicate that the *ABCA1* and *ABCG1* modulation by lipid-lowering drugs in HepG2 cells was not owing to direct alterations in LXR mRNA expression.

So far, we have no knowledge of other studies that have evaluated the influence of statins or ezetimibe on the *ABCG1* level in HepG2 cells. Different transcripts also are known for *ABCG1* [45] and although lipids have been characterized as the most effective transcriptional modulators of *ABCG1* (mainly by LXR activation) [10,46], its regulation and the biological function are not well defined (especially in liver) [8,47] and thus further studies are needed to elucidate them in statin or ezetimibe-treated HepG2 cells.

As long as liver *ABCG1* seems to stimulate biliary cholesterol excretion [47], *ABCG1* upregulation in HepG2 cells (statin- or ezetimibe-mediated), seems to be important for the RCT but this needs to be further investigated.

Finally, there are some limitations to our study. First, our *in vivo* analyses were limited to a small number of individuals, and therefore, additional studies carried out with larger samples, are necessary to confirm our findings. Second, the RCT is a complex process involving several tissues, therefore the choice of a cellular model to evaluate the influence of drugs on mRNA expression of genes involved in this process is a challenging task, especially for studies with humans. We have measured the expression of *ABCG1*, *ABCA1*, *NR1H2* and *NR1H3* in PBMCs because these cells are easily accessible and useful for serving as a biomarker of influence of lipid-lowering drugs on *in vivo* peripheral tissues. However, the expression of these molecules in PBMCs may not directly reflect the expression level in macrophages in the arterial wall. Likewise, the HepG2 cell is not an ideal model because it is derived from hepatocellular carcinoma and is not inserted into a biological system. Nevertheless, the HepG2 cell is a human cell that is easily cultured. Furthermore, we intended not only to carry out comparative analysis between statins and ezetimibe influences in liver tissue and PBMCs, but also to reconcile conflicting reports of the literature involving *ABCA1* transcription in these cells. Future investigations with primary commercially available hepatocytes could improve the physiological relevance of our findings.

Conclusion

In summary, our findings reveal that lipid-lowering drugs downregulate *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in PBMCs of HC individuals and exhibit differential effects on HepG2 cells. Moreover, they indicate that the *ABCA1* and *ABCG1* levels were not correlated directly to LXR mRNA expressions in both cell models treated with lipid-lowering drugs.

Acknowledgements

We thank Cristina M Fajardo, Claudia Villazon, Nadia P Godoy, Verônica S de Oliveira and Helder H Basques for the technical support and helping with the patient selection.

Financial & competing interests disclosure

This study was supported financially by a grant from FAPESP (Projects 2006/06196-0 and 2009/15125-8). Fabiana Dalla Vecchia Genvigir, Alice Cristina Rodrigues, Maria Alice Vieira Willrich and Raquel Oliveira are recipients of fellowships from FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil; Alvaro Cerda is recipient of a fellowship from CONICYT, Chile; Rui Curi, Mario Hiroyuki Hirata and Rosario Dominguez Crespo Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brasília, DF, Brazil. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

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

Executive summary

Aims & materials & methods

- This study describes the effect of the two statins (atorvastatin and simvastatin) and the inhibitor of cholesterol absorption (ezetimibe) on mRNA expression of *ABCA1*, *ABCG1*, *NR1H2* (LXR- β) and *NR1H3* (LXR- α), in HepG2 cells and in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of Brazilian hypercholesterolemic individuals.
- A total of 48 individuals were treated with atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) and 23 were treated with ezetimibe (10 mg/day/4 weeks), followed by simvastatin (10 mg/day/8 weeks) and afterwards by a combined therapy (simvastatin plus ezetimibe, 10 mg each/day/4 weeks).
- HepG2 cells were treated with atorvastatin or simvastatin (0–10 μ M) or ezetimibe (0–5 μ M) for 6, 12 or 24 h.

Results: PBMCs

- *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression was significantly downregulated by lipid-lowering treatments while *NR1H2* and *NR1H3* were not modulated.
- Correlation analysis showed that *ABCA1* and *ABCG1* appear to be coordinately regulated.

Results: HepG2 cells

- *ABCA1* mRNA levels remained unaltered while *ABCG1* expression was increased by statin (1.0–10.0 μ M) or ezetimibe (5.0 μ M) treatments.
- Atorvastatin upregulated *NR1H2* and *NR1H3* only at 10.0 μ M and ezetimibe (1.0–5.0 μ M) downregulated *NR1H2* but did not change *NR1H3*.
- *ABCA1* and *ABCG1* levels were not correlated.
- In both cell models (PBMCs and HepG2), correlation between LXR mRNA expression and *ABCA1* or *ABCG1* level was not found.

Conclusion

- Lipid-lowering drugs downregulate *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in PBMCs of hypercholesterolemic individuals and exhibit differential effects on HepG2 cells.
- *ABCA1* and *ABCG1* levels were not correlated directly to LXR mRNA expression in both cell models treated with lipid-lowering drugs.
- Further investigations are necessary to determine the mechanisms and the clinical relevance of our findings.

cal conduct of research

authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

liography

rs of special note have been highlighted as: interest
f considerable interest

Gotto AM: Review of primary and secondary prevention trials with lovastatin, pravastatin, and simvastatin. *Am. J. Cardiol.* 96(5A), F34–F38 (2005).

Kapur NK, Musunuru K: Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc. Health Risk Manag.* 4(2), 341–353 (2008).

Hausenloy DJ, Yellon DM: Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Postgrad. Med. J.* 84(997), 590–598 (2008).

Cavigliolo G, Shao B, Geier EG, Ren G, Heinicke JW, Oda MN: The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* 47(16), 4770–4779 (2008).

Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A: Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta* 1761(7), 655–666 (2006).

Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E *et al.*: Targeted inactivation of hepatic *ApoA1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.* 115(5), 1333–1342 (2005).

Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J *et al.*: Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 116(4), 1052–1062 (2006).

Lorkowski S, Cullen P: Genetics and molecular biology: the ABC of cholesterol efflux and high-density lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 15(5), 611–613 (2004).

Tall AR, Van-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N: HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* 7(5), 365–375 (2008).

Good review regarding importance of ABCA1 and ABCG1 in reducing macrophage foam cell formation.

- 10 Schmitz G, Langmann T: Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1735(1), 1–19 (2005).
- 11 Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Jessup W, Brown AJ: The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. *Atherosclerosis* 196(1), 180–189 (2008).
- 12 Qiu G, Hill JS: Atorvastatin inhibits ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1 macrophages by an LXR-dependent pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51(4), 388–395 (2008).
- 13 Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A: Effects of pravastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311(1), 420–425 (2004).
- 14 Wong J, Quinn CM, Brown AJ: Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver X receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24(12), 2365–2371 (2004).
- 15 Sone H, Shimano H, Shu M *et al.*: Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316(3), 790–794 (2004).
- 16 Llavriasas G, Rebollo A, Pou J *et al.*: Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem. Pharmacol.* 71(5), 605–614 (2006).
- 17 Genvigir FD, Hirata MH, Hirata RD: ABCA1 expression and statins: inhibitory effect in peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacogenomics* 10(6), 997–1005 (2009).
- 18 Maejima T, Yamazaki H, Aoki T *et al.*: Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(2), 835–839 (2004).
- 19 Hachem SB, Mooradian AD: Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs* 66(15), 1949–1969 (2006).
- 20 Genvigir FD, Soares SA, Hirata MH *et al.*: Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. *Clin. Chim. Acta* 389(1–2), 79–86 (2008).
- 21 WHO: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 894(i–xii), 1–253 (2000).
- 22 Arterial Hypertension Work Groups: IV Brazilian guidelines in arterial hypertension. *Arq. Bras. Cardiol.* 82(Suppl. 4), 7–22 (2004).
- 23 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18(6), 499–502 (1972).
- 24 Rodrigues AC, Curi R, Britto LR *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* 1760(12), 1866–1873 (2006).
- 25 Rodrigues AC, Curi R, Genvigir FD, Hirata MH, Hirata RD: The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 30(7), 956–964 (2009).
- 26 Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR: Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J. Immunol.* 165(5), 2712–2718 (2000).
- 27 Davignon J, Dubuc G: Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) levels. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 120, 163–173 (2009).
- 28 Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F *et al.*: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7), RESEARCH0034 (2002).
- 29 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25(4), 402–408 (2001).
- 30 Li C, Xu M, Gu Q: ATP binding cassette transporter G1 gene expression is reduced in Type 2 diabetic patients. *Endocr. J.* 56(2), 313 (2009).
- 31 Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y: Determinants of leukocyte adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 gene expression in Type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 57(8), 1135–1140 (2008).
- 32 Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M *et al.*: Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 95(6), 530–536 (2004).

- 33 DiBlasio-Smith EA, Arai M, Quinet EM *et al.*: Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J. Transl. Med.* 16, 6:59 (2008).
- 34 Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes Immun.* 6(4), 279–284 (2005).
- 35 Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H *et al.*: HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *J. Atheroscler. Thromb.* 15(1), 20–25 (2008).
- 36 Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ: Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283(2), 700–707 (2008).
- 37 Baranowski M: Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 59(Suppl. 7), 31–55 (2008).
- 38 Repa JJ, Dietschy JM, Tuttle SD: Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte. *J. Lipid. Res.* 43(11), 1864–1874 (2002).
- 39 Seedorf U, Engel T, Lucken A, Bode G, Lorkowski S, Assmann G: Cholesterol absorption inhibitor ezetimibe blocks uptake of oxidized LDL in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320(4), 1337–1341 (2004).
- 40 Zanotti I, Favari E, Sposito AC, Rothblat GH, Bernini F: Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(3), 670–674 (2004).
- 41 Parini P, Gustafsson U, Davis MA *et al.*: Cholesterol synthesis inhibition elicits an integrated molecular response in human livers including decreased ACAT2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(6), 1200–1206 (2008).
- 42 Tamachi N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T *et al.*: Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J. Biol. Chem.* 282(29), 21090–21099 (2007).
- 43 Shimano H: SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.* 276(3), 616–621 (2009).
- 44 During A, Dawson HD, Harrison EH: Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J. Nutr.* 135(10), 2305–2312 (2005).
- 45 Kusuhara H, Sugiyama Y: ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflügers Arch.* 453(5), 735–744 (2007).
- 46 Baldán A, Tarr P, Lee R, Edwards PA: ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. *Curr. Opin. Lipidol.* 17(3), 227–232 (2006).
- 47 Ito T: Physiological function of ABCG1. *Drug News Perspect.* 16(8), 490–492 (2003).

Demonstrates that, in rats, two major *Abca1* transcripts are able to modulate different effects of compactin on liver and peripheral tissue.

Short Communication

***ABCA1* and *ABCG1* expressions are regulated by statins and ezetimibe in Caco-2 cells**

Fabiana D.V. Genvigir^{1,*}, Alice C. Rodrigues¹,
Alvaro Cerda¹, Mario H. Hirata¹, Rui Curi² and
Rosario D.C. Hirata¹

¹ Department of Clinical and Toxicological Analysis,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao
Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

² Department of Physiology and Biophysics, Institute of
Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo,
SP, Brazil

Abstract

Background: Enterocytes play a crucial role in high-density lipoprotein (HDL) biogenesis. Statins and ezetimibe are potent lowering-cholesterol drugs, which can also influence HDL plasma concentrations. We hypothesized that these drugs could modulate the expression of intestinal *ABCA1* and *ABCG1*, two genes involved in HDL metabolism.

Methods: Caco-2 cells were used as a model of the human intestinal cells and were treated with statins (0.01–1 µmol/L) and/or ezetimibe (0.5–5.0 µmol/L) for 12 h or 24 h. Gene expression was examined using real-time PCR.

Results: *ABCA1* level was more abundant than *ABCG1* in Caco-2 cells. *ABCA1* was downregulated after 12-h and 24-h treatment with atorvastatin (0.1 and 1.0 µmol/L) or simvastatin (0.01, 0.1 and 1 µmol/L) ($p < 0.05$). In statin-treated cells, *ABCG1* levels remained unaltered. Ezetimibe alone did not induce change of *ABCA1* or *ABCG1* mRNA levels ($p > 0.05$) but 24-h ezetimibe (2.5 or 5.0 µmol/L) plus simvastatin (1 µmol/L) treatment decreased the transcription of *ABCA1* and *ABCG1* ($p < 0.05$).

Conclusions: Our findings reveal that, at the concentrations studied, statins isolated or combined with ezetimibe, but not ezetimibe alone, downregulate *ABCA1* mRNA expression in Caco-2 cells. Moreover, simvastatin combined with ezetimibe treatment also decrease the *ABCG1* levels in these cells.

Keywords: *ABCA1*; *ABCG1*; Caco-2 cells; lipid-lowering drugs; mRNA expression.

*Corresponding author: Fabiana Dalla Vecchia Genvigir, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 B.17, 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil
Phone: +55-11-30913660, Fax: +55-11-38132197,
E-mail: fdallavecchia@yahoo.com.br
Received December 2, 2010; accepted February 17, 2011;
previously published online March 16, 2011

Plasma cholesterol is derived from two main sources in the body: cholesterol biosynthesis (peripheral and hepatic) and intestinal cholesterol absorption; the relative contribution of cholesterol from these sources depends on various factors, including genetic predisposition, diet and drug therapies [reviewed in (1)]. Lipid-lowering drugs, such as statins and ezetimibe, are used to normalize serum lipids and to reduce risk of cardiovascular disease. Statins are widely prescribed for reduction of serum levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in both the primary and secondary prevention settings [reviewed in (2)]. They act by inhibiting of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and, thereby, suppressing the cholesterol biosynthesis. Ezetimibe is an effective agent for reducing LDL-C, either used alone or in combination with statins. Ezetimibe potently inhibits the absorption of biliary and dietary cholesterol from the small intestine by binding to the Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) transporter, which keeps cholesterol in the intestinal lumen for excretion [reviewed in (2)].

In addition to their LDL-C lowering action, statins and ezetimibe can also influence the metabolism and/or plasma concentrations of other lipoproteins, one of which being the high-density lipoprotein (HDL). The effects of these drugs on plasma HDL-cholesterol (HDL-C) have been assessed in several large clinical trials with variable outcomes: there was no change or modest increase or decrease in HDL-C serum level (3), [reviewed in (1) and (4)].

We have previously shown that lipid-lowering drugs can influence the expression of two important genes involved in the HDL metabolism, *ABCA1* and *ABCG1*, in a cell-specific manner (5). According to our findings, atorvastatin, simvastatin or ezetimibe treatment downregulated *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic individuals, even in the absence of changes in serum HDL-C or apolipoprotein AI (apoAI), the major protein of HDL. On the contrary, in *in vitro* study with human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells, different concentrations of statin or ezetimibe treatments did not alter the *ABCA1* transcription but caused upregulation in the expression of *ABCG1*.

Here, we have examined the effects of these two common statins (atorvastatin and simvastatin) and the ezetimibe on *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in enterocyte (human colorectal adenocarcinoma/Caco-2) cell line. The findings of the present study are relevant because the intestine is an important tissue to study HDL metabolism.

Briefly, Caco-2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 44 mmol/L sodium bicarbonate, 10,000 µg/mL streptomycin and 10,000 UI/mL penicillin. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere, containing 5% CO₂. Culture medium was replaced twice a week and cells were trypsinized and subcultured every 7 days.

Caco-2 cells were treated with atorvastatin (kindly provided by Pfizer Pharmaceuticals Ltd., Guarulhos, SP, Brazil), simvastatin (Sigma, St. Louis, MO, USA) or ezetimibe (kindly provided by Merck/Schering-Plough, NJ, USA) as previously reported (5, 6). For mRNA expression measurements, Caco-2 cells were seeded at a density of 1.0×10^6 cells per 75 cm², cultured for 3 days, and then treated with atorvastatin (0–1 µmol/L), simvastatin (0–1 µmol/L) and/or ezetimibe (0–5 µmol/L) for 12 h or 24 h. For atorvastatin and simvastatin, none of the concentrations tested (0–1.0 µmol/L) in Caco-2 cells induced a loss of cell viability or DNA fragmentation after 24-h treatment (data not shown). Cytotoxicity of ezetimibe was based on the results described elsewhere (7). *ABCA1* and *ABCG1* mRNA levels were measured by TaqMan® quantitative PCR (qPCR) assay using *HMBS* as the reference gene. Details about cytotoxicity assays, cell treatments, primer and probe sequences used for *ABCA1*, *ABCG1* and *HMBS* mRNA detection, qPCR assay and analyses of a relative amount of the transcript in the sample were previously described (5, 6).

In Caco-2 cells, baseline *ABCA1* level was higher than *ABCG1* (data not shown), and corroborating with this result,

the same baseline expression profile was found in hamster enterocytes (8).

Regarding the lipid-lowering drug effects, as shown in Figure 1, we have observed that statins decreased *ABCA1* mRNA expression in a dose-independent manner ($p < 0.05$), but ezetimibe alone did not induce a change of *ABCA1* mRNA levels in Caco-2 cells ($p > 0.05$). Atorvastatin decreased *ABCA1* transcript levels after 12 h at 0.1 (0.55 ± 0.06) and 1.0 µmol/L (0.58 ± 0.04) compared with control (1.00 ± 0.02 , $p < 0.01$). After 24-h treatment, *ABCA1* mRNA levels were significantly decreased also at 0.1 (0.64 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$) and 1.0 µmol/L (0.58 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$). Likewise, after simvastatin treatment, there was also a reduction in *ABCA1* level. This reduction was significant after 12-h and 24-h treatments at 0.01 (12 h: 0.59 ± 0.02 ; 24 h: 0.62 ± 0.04), 0.1 (12 h: 0.50 ± 0.01 ; 24 h: 0.59 ± 0.14) and 1.0 µmol/L (12 h: 0.54 ± 0.06 ; 24 h: 0.55 ± 0.15) compared with controls (12 h: 1.00 ± 0.11 ; 24 h: 1.00 ± 0.15 , $p < 0.05$) (Figure 1). Moreover, compared with the vehicle control, Caco-2 cells treated with 1.0 µmol/L of simvastatin plus 2.5 or 5.0 µmol/L of ezetimibe for 24 h also resulted in a decrease in the *ABCA1* transcription level ($p < 0.05$, Figure 2).

In a study with hamsters treated with cholestyramine (bile acid sequestering resin) and lovastatin, intestinal *ABCA1* mRNA levels remained similar to those in non-treated controls (8). On the contrary, consistent with our finding, treatment with a mixture of pravastatin and colestimide (also a bile acid binding resin) lowered *Abca1* mRNA and protein levels in the intestine of rats (9). This effect in rat intestinal tissue seems to

Figure 1 Effects of lipid-lowering drugs on *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in Caco-2 cells.

Real-time quantitative PCR was performed using total RNA extracted from 12 h and 24 h atorvastatin, simvastatin or ezetimibe-treated and vehicle control (0 µmol/L) cells. The mRNA levels were normalized with *HMBS*. Values are reported as mean $\pm$ SEM up to four independent experiments and expressed as relative value to control ($2^{-\Delta\Delta CT}$ formula was used). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared to 0 µmol/L statin as indicated by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-tests.

Figure 2 Effects of simvastatin and ezetimibe treatments on *ABCA1* and *ABCG1* mRNA expression in Caco-2 cells. Real-time quantitative PCR was performed using total RNA extracted from 24 h simvastatin and ezetimibe-treated and vehicle control (0 μmol/L) cells. The mRNA levels were normalized with *HMBS*. Values are reported as mean±SEM up to four independent experiments and expressed as relative value to control ($2^{-\Delta\Delta CT}$ formula was used). * $p < 0.05$ as compared to 0 μmol/L lipid-lowering drugs as indicated by one-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons.

result from the modulation of a single major *Abca1* transcript, which is liver X receptor response element (LXRE)-driven (9). Because statins inhibit the cholesterol synthesis, they also limit the availability of oxysterols, the true ligand for LXR. Although we have not evaluated *ABCA1* protein expression or activity, Field et al. (10) demonstrated that lovastatin did not alter *ABCA1*-mediated cholesterol efflux in 14-day differentiated Caco-2 cells incubated with LXR agonist, which maximizes the *ABCA1* expression. These same authors also reported that *ABCA1*-mediated cholesterol efflux is independent of normal *NPC1L1* function (10). Moreover, like us, they found that ezetimibe did not alter *ABCA1* transcription (10). Interestingly, in differentiated Caco-2 cells, disruption of the *NPC1L1* resulted in unchanged *ABCA1* mRNA levels (11).

On the contrary, During et al. (12) showed that the mRNA levels for *ABCA1* were significantly lower in 3-week-differentiated Caco-2 cells treated with ezetimibe than in control cells. There are some potential explanations for these different findings: the differentiation status of Caco-2 cells, the ezetimibe addition to the culture medium [During et al. (12) used the Zetia® tablet crushed and not the pure drug] and the cholesterol content into cell culture medium during the ezetimibe treatments. Whereas in Field et al. (10) and in our studies Caco-2 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, the same cells were maintained in the serum-free DMEM culture medium by During et al. (12). This last hypothesis is in agreement with previous observations showing that the treatment with SCH58053, an analog of ezetimibe, did not change *Abca1* mRNA level in enterocytes (jejunal mucosa) of mice fed with a high-cholesterol diet (1.0% w/w cholesterol), although SCH58053 treatment downregulated *Abca1* expression when mice are treated with a basal diet (0.02% w/w cholesterol) (13). Another important explanation for the differences observed between our results and those of During et al. (12) is the reference gene used in qPCR assay. In our experiments, *HMBS* was selected as stable for Caco-2 cells, according to the analysis by GeNorm software® (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) [see

details in (6)]. Nevertheless, During et al. (12) found that in cells treated with ezetimibe, the mRNA level for *HMBS* tended to be lower than in control cells (approx. 54% reduction).

It is important to note that the maximum concentration of ezetimibe used in our study (5 μmol/L) was lower than that of others, but it was a condition established by the pharmaceutical company that provided the pure drug (Merck/Schering-Plough) and it is close to the calculated pharmacologically active concentration (2.5 mg/L or approx. 6 μmol/L) that would be found in the small intestine of a human adult after the intake of the recommended dose (10 mg ezetimibe/day) (12). Likewise, the doses of statins used herein also closely relate to blood levels in patients treated with these drugs. Assuming complete absorption of the drugs, 10 mg of atorvastatin or simvastatin is estimated to result in blood levels of approximately 1.8 μmol/L (in a 70-kg man with a blood volume of 5 L) (14, 15).

It is known that *ABCA1*-mediated assembly of phospholipid and free cholesterol with apoA1 plays an important role in HDL biogenesis, mainly in the liver and to a lesser extent in the small intestine (16). Actually, intestinal *ABCA1* seems to contribute to approximately 30% of the circulating HDL-C (16). Although further studies are needed to confirm it, together, these results support human data showing that statins or ezetimibe either do not significantly alter or modestly change HDL-C or apoA1 levels (3), [reviewed in (1) and (4)].

Unlike the *ABCA1* transcription, in Caco-2 cells, *ABCG1* was not modulated by atorvastatin ($p=0.15$), simvastatin ($p=0.07$) or ezetimibe ($p=0.90$) treatments (Figure 1). Although simvastatin treatment showed a trend to reduce *ABCG1* levels, this reduction, shown in Figure 1, was not significant. Nevertheless, interestingly, *ABCG1* mRNA expression was significantly lower in Caco-2 cells incubated with simvastatin (1.0 μmol/L) plus ezetimibe (2.5 or 5.0 μmol/L) for 24 h than in control cells ($p < 0.05$, Figure 2). In three intestinal segments (duodenum, jejunum and ileum) from hamsters ingesting cholestyramine and lovastatin, expression of *ABCG1* was markedly decreased compared with control animals (8).

At present, despite increasing interest and extensive study, relatively little is known about the role of *ABCG1*. Several transcripts are known for human *ABCG1* and lipids have been characterized as the most effective transcriptional modulators of this gene (mainly by LXR activation) [reviewed in (17)]. Nevertheless, we do not know the regulation and the biological function of *ABCG1* in enterocytes. A previous study suggested different functions of intestinal *ABCG1* and *ABCA1* (8) and it seems that *ABCG1* has no role in lipid absorption (18). Therefore, further studies are needed to elucidate our findings in statin or ezetimibe-treated Caco-2 cells.

In summary, our findings reveal that, at the concentrations studied, statins isolated or combined with ezetimibe, but not ezetimibe alone, downregulate *ABCA1* mRNA expression in Caco-2 cells. Moreover, simvastatin combined with ezetimibe treatment also decrease the *ABCG1* levels in these cells.

Acknowledgments

This study was supported financially by a grant from FAPESP (Project 2009/15125-8). We thank Cristina Moreno Fajardo for the technical support. F.D.V. Genvigir and A.C. Rodrigues are recipients of fellowships from FAPESP, Sao Paulo, SP, Brazil; A. Cerda is recipient of a fellowship from CONICYT, Chile; M.H. Hirata, R. Curi and R.D.C. Hirata are recipients of fellowships from CNPq, Brasilia, DF, Brazil.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Bays HE, Neff D, Tomassini JE, Tershakovec AM. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:447–70.
2. Toth PP. Drug treatment of hyperlipidaemia: a guide to the rational use of lipid-lowering drugs. *Drugs* 2010;70:1363–79.
3. Pearson TA, Denke MA, McBride PE, Battisti WP, Brady WE, Palmisano J. A community-based, randomized trial of ezetimibe added to statin therapy to attain NCEPATPIII goals for LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients: the ezetimibe add-on to statin for effectiveness (EASE) trial. *Mayo Clin Proc* 2005;80:587–95.
4. Sviridov D, Nestel P, Watts G. Statins and metabolism of high density lipoprotein. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007;5:215–21.
5. Genvigir FD, Rodrigues AC, Cerda A, Arazi SS, Willrich MA, Oliveira R, et al. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. *Pharmacogenomics* 2010;11:1235–46.
6. Rodrigues AC, Curi R, Genvigir FD, Hirata MH, Hirata RD. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:956–64.
7. Davignon J, Dubuc G. Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) levels. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2009;120:163–73.
8. Field FJ, Born E, Mathur SN. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* 2004;45:2252–9.
9. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, et al. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 2007;282:21090–9.
10. Field FJ, Watt K, Mathur SN. Origins of intestinal *ABCA1*-mediated HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2008;49:2605–19.
11. Sané AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Ménard D, et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 2006;47:2112–20.
12. Dawson HD, Harrison EH. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and *ABCA1* is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr* 2005;135:2305–12.
13. Repa JJ, Dietschy JM, Turley SD. Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for *ABCA1*, *ABCG5*, or *ABCG8* in the enterocyte. *J Lipid Res* 2002;43:1864–74.
14. Mohammadi A, Macri J, Newton R, Romain T, Dulay D, Adeli K. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:783–93.
15. Bonn V, Cheung RC, Chen B, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Adeli K. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* 2002;163:59–68.
16. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal *ABCA1* directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052–62.
17. Tarr PT, Tarling EJ, Bojanic DD, Edwards PA, Baldán A. Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:584–93.
18. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, et al. *ABCG1* has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005;1:121–31.

APÊNDICE C – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M () F ()

DATA DE NASCIMENTO _____ / _____ / _____

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____

BAIRRO _____ CIDADE _____

CEP _____ TELEFONE: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

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

2. PESQUISADOR: Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

CARGO/FUNÇÃO: docente (FCF-USP)

INSCRIÇÃO CRF: Nº 8876

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

☐	Sem risco	☒	Risco mínimo	☐	Risco médio
☐	Risco baixo	☐	Risco maior		

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS

Prezado Paciente,

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

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

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

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

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

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato comigo (telefones: 3091-3660 e 3091-3634), com o Dr. Egidio Lima Dorea (telefones: 3039-9433 e 3039-9275), ou com o Comitê de Ética do HU/USP (3039-9457) a qualquer hora do dia.

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

São Paulo, _____ de _____ de 200 ____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

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

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário: _____

Documento de identidade Nº: _____ Sexo: M F

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ no. _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Prezado Paciente,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

São Paulo, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

APÊNDICE D – Fichas para coleta de dados individuais do paciente

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome: _____ **Paciente n.º** _____
Data do convite: ____/____/____ **Registro n.º** _____
Data de nascimento: ____/____/____
Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino **Menopausa:** ☐ Pré ☐ Pós
Etnia: ☐ Branca ☐ Parda ☐ Negra ☐ Amarela
Hábito de fumar: ☐ Nunca fumou ☐ Parou de fumar ☐ Há quanto tempo? _____
☐ Fuma n.º de cigarros/dia _____
Consome bebida alcoólica? ☐ Sim ☐ Não
☐ Até 7 doses/sem. ☐ Mais de 7 doses/sem.
Possui algum tipo de doença? ☐ Sim ☐ Não Qual(is)? _____
☐ **Diabetes Mellitus**
Já teve infarto? ☐ Sim ☐ Não Há quanto tempo? _____
É hipertenso? ☐ Sim ☐ Não
 Medida de Pressão arterial: _____ (mmHg)
É obeso? ☐ Sim ☐ Não
 Peso (Kg) _____ Altura (cm) _____ IMC: _____
Toma medicamentos? ☐ Sim ☐ Não
Qual(is)? Em que dosagem? _____
Profissão: _____ Há exigência de esforço físico? ☐ Sim ☐ Não
Pratica exercício físico? ☐ Sim ☐ Não

HISTÓRICO FAMILIAR

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

☐ Diabetes Mellitus ☐ Obesidade ☐ Hipertensão
☐ Doenças cardiovascular Quem? _____
☐ Hipercolesterolemia Quem? _____
☐ Não tem ☐ Não sabe

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

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

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

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Nome: _____

Paciente n.º _____

Registro _____

Data do convite: _____ / _____ / _____

Data de nascimento: _____ / _____ / _____

Sexo: M-1 () F-2 ()

Menopausa: Pré-1 () Pós-2 ()

Etnia: Branca ()

Parda ()

Negra ()

Amarela ()

Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () Há quanto tempo? _____

Fuma () N.º de cigarros/dia _____

Consome bebida alcoólica? Sim () Não ()

Até 7 doses/sem. ()

Mais de 7 doses/sem. ()

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

Diabetes Mellitus Sim () Não ()

Já teve infarto? Sim () Não () Há quanto tempo? _____

É hipertenso? Sim () Não ()

Medida de Pressão arterial: _____ (mmHg)

É obeso? Sim () Não ()

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

Toma medicamentos? Sim () Não ()

Qual(is)? Em que dosagem? _____

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

Pratica exercício físico? Sim () Não () Com que frequência: _____

Observações

HISTÓRICO FAMILIAR

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

Diabete Mellitus () Quem? _____

Doença cardiovascular () Quem? _____ Obesidade () Quem? _____

Hipercolesterolemia () Quem? _____ Hipertensão () Quem? _____

Não tem () Não sabe ()

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Triagem	Após dieta (4 semanas) BASAL	Após 10 mg Ezetimiba (4 sem)	Após 10 mg Sinvastatina (8 sem)	Associação Sinva/Eze (4 sem)
Data:	Data:	Data:	Data:	Data:
GLI	GLI	CT	CT	CT
CT	CT	TG	TG	TG
TG	TG	HDL-C	HDL-C	HDL-C
HDL-C	HDL-C	LDL-C	LDL-C	LDL-C
LDL-C	LDL-C	VLDL-C	VLDL-C	VLDL-C
VLDL-C	VLDL-C	CK	CK	CK
HbA1C	ALT	ALT	ALT	ALT
	AST	AST	AST	AST
	CK	GLI	GLI	GLI
	T4L	HbA1C	HbA1C	HbA1C
	TSH			
	C			
	U			
	HbA1C			

CT: colesterol total/ GLI: glicemia/ TG: triglicerídeos/ HbA1C: hemoglobina glicada

ANEXOS

**ANEXO A – Cópias das aprovações dos protocolos de estudo pela
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)**

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

PARECER Nº 1360/2004

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

Registro CEP: 358/03

Processo nº 25000.041535/2004-01

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

Pesquisador Responsável: Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata

Instituição: HU - USP

Área Temática Especial: Genética Humana

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

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

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

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 15 de julho de 2004.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

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

PARECER Nº 766/2005

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

Registro CEP: 283

Processo nº 25000.188434/2004-95

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

Pesquisador Responsável: Dr. Rosário Dominguez Crespo Hirata.

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

Área Temática Especial: Genética humana.

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

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

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

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 22 de abril de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE

Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B – Ficha do Aluno

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial**FICHA DO ALUNO****9136 - 5332347/2 - Fabiana Dalla Vecchia Genvigir**

Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil - 2003

Mestrado: Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007

Curso: Doutorado

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 04/07/2007

Início da Contagem de Prazo: 04/07/2007

Data Limite: 04/07/2011

Orientador: Prof(a). Dr(a). Rosario Dominguez Crespo Hirata - 04/07/2007 a 08/09/2011
E.Mail: rosariohirata@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/05/2010

Data do Depósito do
Trabalho: 16/06/2011

Título do Trabalho: "Efeito de hipolipemiantes sobre a expressão de genes
envolvidos no transporte reverso do colesterol"

Data Máxima para
Aprovação da Banca: 15/08/2011

Data de Aprovação da
Banca: 22/06/2011

Data Máxima para Defesa: 20/09/2011

Data da Defesa: 08/09/2011

Resultado da Defesa: Aprovado

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 04/07/2007
Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

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

Impresso em: 29/09/11 09:56:44

9136 - 5332347/2 - Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-1/2	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	75	A	N	Concluída
BMB5790-4/2	Métodos de Biologia Molecular Aplicados ao Estudo de Proteínas de Membrana	13/08/2007	28/09/2007	150	10	100	A	N	Concluída
MCM5725-4/4	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lípidos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/11/2007	09/12/2007	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5761-5/2	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	03/03/2008	30/03/2008	60	4	85	A	N	Concluída

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

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.

9136 - 5332347/2 - Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
50448	Rosario Dominguez Crespo Hirata	FCF - USP	Presidente
523657	Edna Regina Nakandakare	FM - USP	Membro
601484	Eliana Cotta de Faria	UNICAMP - Externo	Membro
7537356	Maria Jose Brion Martinez	SANTIAGO - Externo	Membro
634518	Egidio Lima Dorea	Externo	Membro

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

Impresso em: 29/09/11 09:56:44

ANEXO C – Currículo Lattes do aluno**Fabiana Dalla Vecchia Genvigir**

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007 - 2011** Doutorado em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: EFEITO DE HIPOLIPEMIANTES SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE REVERSO DO COLESTEROL, Ano de obtenção: 2011
Orientadora: ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2005 - 2007** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DE POLIMORFISMOS DO GENE ABCA1 EM INDIVÍDUOS SOB TERAPIA HIPOLIPEMIANTE, Ano de obtenção: 2007
Orientadora: ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2004** Graduação em Habilitação em Bioquímica.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil
- 2000 - 2003** Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

Formação complementar

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Treinamento de PCR em tempo real.
Life Technologies , LIFE TEC, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Atualização em biologia molecular aplicada.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2005** Apoio Técnico em Pesquisa.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2004** Monitoria Acadêmica Em Hematologia.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil
- 2004 - 2004** Projeto de Ensino Em Análises Clínicas.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Estadual de Londrina
- 2004 - 2004** Colaboradora - Pesquisa Interações Medicamentosas.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
- 2002 - 2004** Estágio em Coletas de Materiais Biológicos.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
- 2004 - 2004** Estágio: Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2003 - 2004	Estágio em Lab. de urgências - Análises Clínicas. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil
2000 - 2003	Iniciação Científica em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2003 - 2003	Curso de curta duração em Procedimentos básicos para farmacêuticos. Associação dos Farmacêuticos de Londrina, AFL, Brasil
1998 - 1998	Estágio Extracurricular Em Nutrição e Dietética. Hospital São José, HSJ, Brasil

Projetos

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: Pesquisa

2006 - 2009	Estudo farmacogenômico de hipolipemiantes: efeitos sobre a expressão gênica de fatores de transcrição envolvidos na regulação do colesterol
--------------------	---

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

2005 - Atual	Influência do tratamento com estatinas e/ou ezetimiba sobre a expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol
---------------------	---

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

2004 - 2005	Qualidade em Carne de Frango. Biologia Molecular, Análise Sensorial e Física na Avaliação da Interrelação das Proteínas do Estresse Térmico e Receptora da Rianodina na Ocorrência de Carnes PSE.
--------------------	---

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

2000 - 2003	Qualidade em Carnes de Frango: genética e bioquímica em produtos cárneos de umidade intermediária
--------------------	---

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Revisor de periódico

1. Journal of Clinical and Experimental Cardiology (ISSN 2155-9880) -

Vínculo

2011 - Atual Regime: Parcial

2. Metabolism, Clinical and Experimental (Print) -

Vínculo

2010 - Atual Regime: Parcial

3. Pharmacogenomics (London) -

Vínculo

2010 - Atual Regime: Parcial

4. Clinica Chimica Acta -

Vínculo

2008 - Atual Regime: Parcial

Prêmios e títulos

2008	Premio Doles de melhor trabalho de Bioquímica Clínica apresentado no 2008 IFCC Annual Meeting, Sociedade Brasileira de Análises Clínicas., Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
2005	MENÇÃO HONROSA, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
2003	LÁUREA ACADÊMICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
1998	ALUNO DESTAQUE, CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DO PARANÁ

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Genvigir, Fabiana D.V., Rodrigues, Alice C., Cerda, Alvaro, Hirata, Mario H., Curi, Rui, Hirata, Rosario D.C. ABCA1 and ABCG1 expressions are regulated by statins and ezetimibe in Caco-2 cells. Drug Metabol Drug Interact., v.26, p.33 - 36, 2011

2. Cerda, Álvaro, 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.

3. RODRIGUES, A. C., PERIN, P. M. S., PURIM, S. G., SILBINGER, V. N., Genvigir, Fabiana DV, WILLRICH, M. A. V., ARAZI, S. S., LUCHESSI, A. D., HIRATA, M. H., BERNIK, M. M. S., Dorea, E. L., SANTOS, C., FALUDI, A. A., BERTOLAMI, M. C., SALAS, A., FREIRE, A., LAREU, M. V., PHILLIPS, C., PORRAS-HURTADO, L., FONDEVILA, M., CARRACEDO, A., HIRATA, R. D. C. Pharmacogenetics of OATP transporters reveals that SLCO1B1 c.388A>G variant is determinant of increased atorvastatin response. *International Journal of Molecular Sciences (Online)*, v.12, p.5815 - 5827, 2011.
4. 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)*, v.11, p.1235 - 1246, 2010.
5. Cerda, Álvaro, 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)*, v.411, p.631 - 637, 2010.
6. REBECCHI, I, RODRIGUES, A, ARAZI, S, GENVIGIR, F, WILLRICH, M, HIRATA, M, SOARES, S, BERTOLAMI, M, FALUDI, A, BERNIK, M, Dorea, E. L., DAGLI, M. L. Z., AVANZO, J. L., HIRATA, R. D. C. ABCB1 and ABCC1 expression in peripheral mononuclear cells is influenced by gene polymorphisms and atorvastatin treatment. *Biochemical Pharmacology*, v.77, p.66 - 75, 2009.
7. Genvigir, Fabiana DV, Hirata, Mario H, Hirata, Rosario DC. ABCA1 expression and statins: inhibitory effect in peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacogenomics (London)*, v.10, p.997 - 1005, 2009.
8. CERDA, A., ARAZI, S. S., GENVIGIR, F, HIRATA, M. H., Dorea, Egidio L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, R. D. C. 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.
9. Rodrigues, Alice Cristina, Curi, Rui, Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia, Hirata, Mario Hiroyuki, Hirata, Rosario Dominguez Crespo. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.30, p.956 - 964, 2009.
10. ARAZI, S, GENVIGIR, F, WILLRICH, M, HIRATA, M, DOREA, E, BERNIK, M, HIRATA, R. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. *Clinica Chimica Acta (Print)*, v.393, p.119 - 124, 2008.
11. WILLRICH, M, HIRATA, M, GENVIGIR, F, ARAZI, S, REBECCHI, I, RODRIGUES, A, BERNIK, M, DOREA, E, BERTOLAMI, M, FALUDI, A, HIRATA, R. D. C. CYP3A5?3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. *Clinica Chimica Acta (Print)*, v.398, p.15 - 20, 2008.
12. GENVIGIR, F, SOARES, S, HIRATA, M, WILLRICH, M, ARAZI, S, REBECCHI, I, OLIVEIRA, R, BERNIK, M, DOREA, E, BERTOLAMI, M, HIRATA, R. D. C. Effects of ABCA1 SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. *Clinica Chimica Acta (Print)*, v.389, p.79 - 86, 2008.
13. ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, YOUSSEF, Elza Y., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, PINHEIRO, João Waive, SHIMOKOMAKI, Massami. Agregando valor à avicultura de postura. O descarte racional pode transformar poedeiras em dinheiro.. *Avicultura Industrial (Porto Feliz)*, v.1096, p.20 - 24, 2001.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CERDA, A., Genvigir, Fabiana DV, ROHDE, C.B., ISSA, M. H., CAVALLI, S. A., BERTOLAMI, M. C., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Atorvastatin and hormone replacement therapy affect expression of genes regulating the reverse cholesterol transport in mononuclear cells from postmenopausal women In: 79th EAS Congress, 2011, Gothenburg. **Atherosclerosis supplements.** , 2011. v.12. p.45 - 45
2. RODRIGUES, A. C., Genvigir, Fabiana DV, ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Association between polymorphisms os ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters and atorvastatin response in Brazilian hypercholesterolemic individuals In: 3rd FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins - from multidrug resistance to genetic diseases, 2010, Innsbruck. **ABC2010 - 3rd Special Meeting on ABC Proteins.** , 2010. p.159 - 159
3. ISSA, M. H., CERDA, A., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CAVALLI, S. A., BERTOLAMI, M. C., FALUDI, A. A., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Atorvastatin down-regulates APOE mRNA expression in postmenopausal women In: 5th Santorini Conference. Functional genomics towards personalized health care, 2010, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** , 2010. v.48. p.A68 - A68
4. WILLRICH, M. A. V., Genvigir, Fabiana D.V., RODRIGUES, A. C., ARAZI, S. S., OLIVEIRA, R., MAUREIRA A. D. C., Dorea, E. L., BERNIK, M, Hirata, Mario Hiroyuki, HIRATA, R. D. C. CYP3A4 and CYP3A5 mRNA Expression in Hypercholesterolemic Individuals treated with Ezetimibe In: Simposio Anual de Pesquisas em Ciencias Farmaceuticas, 2010, São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** São Paulo: , 2010. v.46(S2). p.44 -
5. Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia, RODRIGUES, A. C., Hirata, Mario Hiroyuki, Curi, Rui, HIRATA, R. D. C. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in Caco-2 cells In: 5th Santorini Conference. Functional genomics towards personalized health care, 2010, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** , 2010. v.48. p.A66 - A66
6. CERDA, A., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., ARAZI, S. S., OLIVEIRA, R., Dorea, E. L., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Influence of polymorphisms and cholesterol-lowering treatment on SCARB1 mRNA expression In: 5th Santorini Conference. Functional genomics towards personalized health care, 2010, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** , 2010. v.48. p.A64 - A64
7. OLIVEIRA, R., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CERDA, A., Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., JORGE, M. E. I., FAJARDO, C. M., CREMA, D., MACHADO, J. E. A., MARTINEZ, M. B., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Polymorphism of the gene of Lep, LEPR, AdipoQ and IL-6 and possible involvement in obesity and diabetes mellitus in Brazilian population In: 5th Santorini Conference. Functional genomics towards personalized health care, 2010, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** , 2010. v.48. p.A56 - A56
8. WILLRICH, M. A. V., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., ARAZI, S. S., OLIVEIRA, R., HIRATA, M. H., Dorea, E. L., HIRATA, R. D. C. Relationships among CYP3A4 and CYP3A5 haplotypes, mRNA expression, CYP3A activity and atorvastatin response in hypercholesterolemic individuals In: AACC Annual Meeting 2010, 2010. **Clinical Chemistry.** , 2010. v.56. p.A89 - A89
9. RODRIGUES, A. C., Genvigir, Fabiana D.V., WILLRICH, M. A. V., ARAZI, S. S., Hirata, Mario H, Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, R. D. C. The contribution of genetic polymorphisms in 60 candidate genes to variability in atorvastatin response In: Simposio Anual de Pesquisas em Ciencias Farmaceuticas, 2010, São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** São Paulo: , 2010. v.46(S2). p.77 -
10. RODRIGUES, A. C., PERIN, P., PURIM, S., Genvigir, Fabiana D.V., WILLRICH, M. A. V., ARAZI, S. S., HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, R. D. C. Association between polymorphisms of the hepatic uptake transporter SLCO1B1 and reduced atorvastatin response In:

AACC Annual Meeting 2009, 2009, Chicago. **Clinical Chemistry**. , 2009. v.55. p.A87 - A87

11. Genvigir, Fabiana DV, RODRIGUES, A. C., HIRATA, M. H., WILLRICH, M. A. V., CURI, R., HIRATA, R. D. C. Effects of statins on expression of genes involved in reverse cholesterol transport in HepG2 cells In: XII Congresso Brasileiro de Aterosclerose, 2009, Campinas. **Atherosclerosis Supplements**. Elsevier, 2009. v.10. p.13 - 14

12. RODRIGUES, A. C., Genvigir, Fabiana DV, ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Alteração da expressão dos transportadores do tipo ABC e SLC no estado hiperlipidêmico e após tratamento com atorvastatina In: XI São Paulo Research Conferences: Medicina molecular e farmacogenética, 2008, São Paulo. **XI São Paulo Research Conferences**. , 2008. p.16 - 16

13. RODRIGUES, A. C., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. Alteration of the expression of efflux and uptake transporters during hypercholesterolemia. Role in variability of atorvastatin response In: Fourth Santorini Conference Biologie Prospective - Funtional Genomics towards Personalized Health Care, 2008, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.A138 - A138

14. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., RODRIGUES, A. C., HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. Atorvastatin down-regulates ABCA1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells of Brazilian hypercholesterolemic patients In: Fourth Santorini Conference Biologie Prospective - Funtional genomics towards personalized health care, 2008, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.A130 - A130

15. WILLRICH, M. A. V., HIRATA, M. H., RODRIGUES, A. C., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ARAZI, S. S., CURI, R., HIRATA, R. D. C. CYP3A4 and CYP3A5 mRNA expression are affected by atorvastatin in HepG2 cell line In: Fourth Santorini Conference Biologie Prospective - Funtional Genomics towards Personalized Health Care, 2008, Santorini. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.A143 - A143

16. ARAZI, S. S., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, WILLRICH, M. A. V., HIRATA, M. H., NAKANDAKARE, E. R., NEVES, MST, HIRATA, R. D. C. mRNA EXPRESSION OF SREBF1 AND NPC1L1 GENES IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IS MODULATED BY SIMVASTATIN COMBINED WITH EZETIMIBE THERAPY In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and 35th Brazilian Congress of Clinical Analysis, 2008, Fortaleza. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.S570 - S571

17. ARAZI, S. S., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, WILLRICH, M. A. V., HIRATA, M. H., OLIVEIRA, R., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. mRNA expression of SREBF1, SREBF2 and SCAP transcription factors in peripheral mononuclear cells is modulated by atorvastatin therapy In: 2008 American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, 2008, Washington. **Clinical Chemistry**. , 2008. v.56. p.A150 - A150

18. CERDA, A., ARAZI, S. S., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE I POLYMORPHISMS AND ITS RELATION WITH SERUM LIPIDS PROFILE AND RESPONSE TO ATORVASTATIN IN BRAZILIAN INDIVIDUALS In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and 35th Brazilian Congress of Clinical Analysis, 2008, Fortaleza. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.S571 - S572

19. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., HIRATA, M. H., WILLRICH, M. A. V., ARAZI, S. S., CURI, R., HIRATA, R. D. C. UP-REGULATION OF ABCG1 mRNA EXPRESSION BY ATORVASTATIN IN HEPG2 CELLS In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and 35th Brazilian Congress of Clinical Analysis, 2008, Fortaleza. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. Walter de Gruyter, 2008. v.46. p.S563 - S563

20. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, HIRATA, M. H., SOARES, S. A., WILLRICH, M. A. V., ARAZI,

S. S., REBECCHI, I. M. M., BERNIK, M. M., Dorea, E. L., HIRATA, R. D. C. Associação do polimorfismo R219K do gene ABCA1 com perfil lipídico sérico menos aterogênico In: XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2007, São Paulo. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Casa Editorial Ventura, 2007. v.17. p.59 - 59

21. ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. Atorvastatin effects on SREBF1 and SCAP gene expression in peripheral blood mononuclear cells of hypercholesterolemic patients In: Pharmaceutical Sciences World Congress, 2007, Amsterdam. **Pharmaceutical Sciences World Congress**. , 2007.

22. ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, OLIVEIRA, V. S., BASQUES, H. H., HIRATA, M. H., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., HIRATA, R. D. C. Efeito da atorvastatina sobre os genes SREBF1, SREBF2 e SCAP em pacientes hipercolesterolêmicos In: XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2007, São Paulo. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Casa Editorial Ventura, 2007. v.17. p.106 - 106

23. GONZALES, C. V., HIRATA, M. H., ARAZI, S. S., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, WILLRICH, M. A. V., HIRATA, R. D. C. Efeito da variante 29 do gene da HMGCOA redutase sobre o perfil lipídico em resposta ao tratamento com atorvastatina In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2007, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. , 2007. v.43. p.19 - 19

24. WILLRICH, M. A. V., HIRATA, M. H., FALUDI, A., BERTOLAMI, M. C., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ARAZI, S. S., RODRIGUES, A. C., HIRATA, R. D. C. Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da CYP3A5 em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina In: 34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2007, Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. , 2007. v.39. p.42B - 42B

25. HIRATA, R. D. C., WILLRICH, M. A. V., Dorea, E. L., BERNIK, M. M., BERTOLAMI, M. C., FALUDI, A., REBECCHI, I. M. M., SORKIN, S. C., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., BASQUES, H. H., OLIVEIRA, V. S., HIRATA, M. H. Cholesterol-lowering response to atorvastatin is modified by CYP3A5*3 allele in Brazilian hypercholesterolemic patients In: American Association of Clinical Chemistry Annual Meeting, 2006, Chicago. **Clinical Chemistry**. Washington DC: AACC Press, 2006. v.52. p.A54 - A55

26. SORKIN, S. C., HIRATA, M. H., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, NAKANDAKARE, E. R., Dorea, E. L., BERNICK, M., BERTOLAMI, M. C., FALUDI, A., HIRATA, R. D. C. Efeitos de polimorfismo genético do SREBF1 sob o perfil lipídico sérico de indivíduos sob terapia hipolipemiante In: 33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. , 2006. v.38 (2). p.21B - 21B

27. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, HIRATA, M. H., SOARES, S. A., SORKIN, S. C., WILLRICH, M. A. V., REBECCHI, I. M. M., BERNICK, M., Dorea, E. L., HIRATA, R. D. C. Efeitos do polimorfismo G1051A do gene ABCA1 no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos In: 33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2006, Curitiba. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. , 2006. v.38 (2). p.20B - 20B

28. OLIVEIRA, V. S., WILLRICH, M. A. V., SORKIN, S. C., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Influência do polimorfismo da apolipoproteína E sobre a expressão gênica e o perfil lipídico sérico em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina In: 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, São Paulo. **13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica**. , 2005.

29. OLIVEIRA, V. S., WILLRICH, M. A. V., SORKIN, S. C., Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, RODRIGUES, A. C., HIRATA, R. D. C. Influência do polimorfismo da apolipoproteína E sobre o perfil lipídico sérico em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo. **XL Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**. , 2005.

30. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, SOUZA, Joice Mara Cruciol e. Avaliação da nomenclatura dos medicamentos nas prescrições para adultos internados no Hospital Universitário de Londrina In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2004, Londrina-PR. **CD-ROM do XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** , 2004.
31. MENDES, Josiane, KREMPEL, Juliana, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CAMARGO, Alissana Ester Iakmiu, REICHE, Fernando Vissoci, REICHE, Edna Maria Vissoci. Avaliação das Alterações Clínicas e Laboratoriais em Pacientes com Mola Hidatiforme atendidas no Hospital Universitário de Londrina: Relato de Caso In: VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial, 2004, Londrina. **Anais da VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial.** Londrina: Gráfica UEL, 2004. p.61 - 61
32. CARLETTO, Marli, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ANTONIETTI, Gustavo Henrique, CATISTI, Douglas Godoy, SOUZA, Joice Mara Cruciol e. Avaliação dos dados referentes às doses dos medicamentos prescritos na enfermaria do Hospital Universitário de Londrina In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2004, Londrina - PR. **CD-ROM do XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** , 2004.
33. SOUZA, Joice Mara Cruciol e, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CARLETTO, Marli, CATISTI, Douglas Godoy, ANTONIETTI, Gustavo Henrique. Características das Prescrições das Enfermarias do Hospital Universitário In: VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial, 2004, Londrina. **Anais da VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial.** Londrina: Gráfica UEL, 2004. p.108 - 108
34. ANTONIETTI, Gustavo Henrique, CATISTI, Douglas Godoy, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CARLETTO, Marli, SOUZA, Joice Mara Cruciol e. Características gerais das prescrições medicamentosas para adultos internados no Hospital Universitário de Londrina In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2004, Londrina - PR. **CD-ROM do XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** , 2004.
35. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CAMARGO, Alissana Ester Iakmiu, MENDES, Josiane, KREMPEL, Juliana, TESSER, Egídio, OLIVEIRA, Jair Aparecido de, BARBOSA, Décio Sabbatini. Complicações Clínicas Decorrentes de Tratamento Inicial Inadequado a Paciente Vítima de Acidente Crotálico: Um Relato de Caso In: VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial, 2004, Londrina. **Anais da VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial.** Londrina: Gráfica UEL, 2004. p.34 - 34
36. CATISTI, Douglas Godoy, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CARLETTO, Marli, ANTONIETTI, Gustavo Henrique, SOUZA, Joice Mara Cruciol e. Problemas relacionados com medicamentos: qualidades das informações presentes nas prescrições para a dispensação em dose individual no Hospital Universitário de Londrina In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2004, Londrina - PR. **CD-ROM do XIII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** , 2004.
37. SOUZA, Joice Mara Cruciol e, CATISTI, Douglas Godoy, ANTONIETTI, Gustavo Henrique, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, CARLETTO, Marli. Qualidade das Informações Presentes nas Prescrições de Enfermaria do Hospital Universitário In: VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial, 2004, Londrina. **Anais da VII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e I Encontro de Farmácia Industrial.** Londrina: Gráfica UEL, 2004. p.110 - 110
38. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, Guarnieri, Paulo D., SHIMOKOMAKI, Massami. Manejo pré-abate de frangos: o emprego de nebulizador e ventilador acarreta mudanças na cor dos filés de peito em uma planta comercial In: XII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 2003, Foz do Iguaçu - PR. **CD-ROM do XII Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.** Foz do Iguaçu: Unioeste, 2003.
39. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, SOARES, Adriana Lourenço, IDA, Elza Iouko, SHIMOKOMAKI, Massami. Obtenção de Parâmetros de Medidas para Caracterização de Carnes PSE em Frangos In: XI Encontro anual de iniciação científica, 2002, Maringá - PR. **CD-ROM do XI Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC / CNPq.** , 2002.

40. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, YOUSSEF, Elza Y., CORÓ, Fábio Augusto Garcia, SHIMOKOMAKI, Massami. Charque de Frangos: Uso de aditivos (antioxidantes) na preservação da rancidez In: X Encontro anual de iniciação científica e I Encontro de pesquisa da UEPG, 2001, Ponta Grossa - PR. **Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica e I Encontro de Pesquisa da UEPG**. Ponta Grossa: UEPG, 2001. p.219 - 220

41. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, YOUSSEF, Elza Y., PINHEIRO, João Waine, SHIMOKOMAKI, Massami. Controle do Aroma de Requentado em Cortes Salgados de Poedeiras In: X Encontro Anual de Iniciação Científica e I Encontro de Pesquisa da UEPG, 2001, Ponta Grossa - PR. **Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica e I Encontro de Pesquisa da UEPG**. Ponta Grossa: UEPG, 2001. p.218 - 219

42. ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, YOUSSEF, Elza Y., CORÓ, Fábio Augusto Garcia, SHIMOKOMAKI, Massami. Estudo Comparativo entre Associações de Antioxidantes na Inibição da Rancidez em Cortes Salgados de Frango In: 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2001, Campinas - SP. **Livro de Resumos do 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas: UNICAMP, 2001. p.222 - 222

Apresentação de Trabalho

1. Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia. **Efeito inibitório de estatinas sobre a expressão de ABCA1 em células mononucleares do sangue periférico**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

2. RODRIGUES, A. C., Genvigir, Fabiana DV, ARAZI, S. S., WILLRICH, M. A. V., Dorea, E. L., BERNIK, M. M. S., HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. **Alteração da expressão dos transportadores do tipo ABC e SLC no estado hiperlipidêmico e após tratamento com atorvastatina**, 2008. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

3. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, HIRATA, M. H., SOARES, S. A., WILLRICH, M. A. V., ARAZI, S. S., REBECCHI, I. M. M., BERNIK, M. M. S., Dorea, E. L., HIRATA, R. D. C. **Associação do polimorfismo R219K do gene ABCA1 com perfil lipídico sérico menos aterogênico**, 2007. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

4. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, SOUZA, Joice Mara Cruciol e. **Avaliação da nomenclatura dos medicamentos nas prescrições para adultos internados no Hospital Universitário de Londrina**, 2004. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

5. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, SHIMOKOMAKI, Massami, Guarnieri, Paulo D. **Manejo pré-abate de frangos. O emprego de nebulizador e ventilador acarreta mudanças na cor dos filés de peito em uma planta comercial**, 2003. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

6. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, SOARES, Adriana Lourenço, IDA, Elza louko, SHIMOKOMAKI, Massami. **Obtenção de parâmetros de medidas para caracterização de carnes PSE em frangos**, 2002. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

7. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, YOUSSEF, Elza Y., CORÓ, Fábio Augusto Garcia, SHIMOKOMAKI, Massami. **Charque de Frangos. Uso de aditivos (antioxidantes) na preservação da rancidez**, 2001. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

8. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F, ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo, YOUSSEF, Elza Y., PINHEIRO, João Waine, SHIMOKOMAKI, Massami. **Controle do aroma de requentado em cortes salgados de poedeiras**, 2001. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Processos ou técnicas sem registro ou patente

1. Genvigir, Fabiana D.V., HIRATA, R. D. C. **Registro de variante do gene ABCA1 no GeneBank do NCBI (rs56064613).**, 2008

Demais produções técnicas

1. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F. **Mutações, Polimorfismos e Doenças - Aula no curso Gestão Antienvhecimento – Lato Sensu**, 2007. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

2. Genvigir, FDV ou Dalla-Vecchia, F. **Palestra Escolha de iniciadores e sondas marcadas e sistemas de marcação dentro do I Curso de atualização em biologia molecular aplicada ao diagnóstico**, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)