

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Estudo de alterações no gene da enzima CYP3A4 que
influenciam a resposta a atorvastatina em indivíduos
hipercolesterolêmicos**

Selma Andréa Cavalli

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata

**São Paulo
2003**

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Estudo de alterações no gene da enzima CYP3A4 que
influenciam a resposta a atorvastatina em indivíduos
hipercolesterolêmicos**

Selma Andréa Cavalli

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Assoc. **Rosario Dominguez Crespo Hirata**

São Paulo
2003

17945

DEDALUS - Acervo - CQ



30100006117

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

Cavalli, Selma Andréa
C377e Estudo de alterações no gene da enzima CYP3A4 que
influenciam a resposta a atorvastatina em indivíduos
hipercolesterolêmicos / Selma Andréa Cavalli. -- São
Paulo, 2003.
120p.

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

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Bioquímica clínica 2. Biologia molecular 3.
Farmacogenética I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez
Crespo, orientador.

616.0756 CDD

Selma Andréa Cavalli

Estudo de alterações no gene da enzima CYP3A4 que
influenciam a resposta a atorvastatina em indivíduos
hipercolesterolêmicos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. **Rosário Dominguez Crespo Hirata**
Orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

À DEUS,
Pelo dom da Vida e
Por sua constante companhia...
pois sei que, nesta caminhada, nos momentos de
maior dificuldade, foi Ele quem me carregou no colo.

Aos meus grandes amigos e Pais

Alfredo e Maria Alice

*Por sempre terem me apoiado e incentivado nesse
caminho, pela força, orientação e confiança.*

Pelo amor incondicional!

*Ao meu irmão e sempre amigo **Sérgio***

Pelo companheirismo, pela alegria.

Pelo carinho!

*Aos meus queridos **Bibi** e **Vivi**, pela alegria e bons
momentos que me proporcionam!*

Meu mais profundo agradecimento a vocês.

Eu os amo!

*À querida Profa. Assoc. **Rosário D.C. Hirata***

Pela orientação muito mais do que científica

Pela dedicação para com cada um de nós.

Pela ajuda e incentivo.

*Pela competência e rigor científico que muito contribuíram
na realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Assoc. **Mário H. Hirata***

Pela sua insistência em ajudar a todos

*Pelas oportunidades que cria, pelo entusiasmo, por todo
ensinamento que proporciona e dedicação.*

*Agradeço pelo carinho com que me ajudaram a conduzir
minha formação e pela compreensão em todos os
momentos!*

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini, que vem contribuindo para minha formação profissional desde a graduação. Minha admiração, meu respeito e meu muito obrigada!

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

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

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, representado pelo Dr. Marcelo Bertolami, pelo fornecimento das amostras e por suas valiosas colocações e sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, representado pelos médicos, Jayme Diament e Neusa Forti, pelo fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe Prof. Dr. Carlos A. C. Sannazzaro, que forneceu parte das amostras utilizadas neste trabalho.

À Divisão de Higiene/Segurança Medicina do Trabalho (DHSMT) da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento de parte das amostras utilizadas neste estudo.

Aos pacientes das diferentes instituições envolvidas nesse estudo, que contribuíram de maneira anônima para o melhor entendimento dos fatores que influenciam a resposta terapêutica no tratamento das dislipidemias.

Ao Dr. Guey-Jen Lee-Chen, do Dept. of Biology, National Taiwan Normal University, pelo fornecimento de amostras de DNA controle.

À Indústria Farmacêutica Pfizer, em nome do Dr. André Yamada, pela cessão do medicamento – atorvastatina – utilizado neste estudo.

À Companhia Equipadora de Laboratório Modernos – CELM, empresa na qual trabalhei em boa parte do período de desenvolvimento deste trabalho. Pelo incentivo, meu sincero agradecimento!

Agradecimentos Pessoais

Aos grandes amigos e colaboradores deste trabalho: Dr. Luis Antonio Salazar Navarrete, Dra. Ivanise Rebecchi, Dr. Mustafá Issa e Leonardo Matsumoto, pela ajuda, incentivo, companheirismo e insistência quando tudo parecia que não ia dar certo.....

Aos amigos que um dia passaram ou que ainda são presença agradável no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, Maria Fernanda Pimentel de Carvalho, Neuza Satomi Sato, Elizabeth Cecília R. Guzmán, Jo Yoshikumi Osugue, Marcos de Oliveira Machado, Rozangela Verlengia, Sun Ok Yoon, Andréa Luciana Araújo da Cunha, Dorra Hilal El-Andere, Heluih Ata Abdallah, Hemerson Bertassoni Alves, Katlin Brauer Massirer, Márcia K.M. Nakamura, Regina Celia Paschoal, Silvério Teixeira dos Santos, Thais Martins de Lima, Alexandre Rebellato de Lima, Adriana Natsui Osaki, Renata Salem Bouabci, Patrícia Braga, Sílvio Tsukuda, Sun Ok Yoon, Rosilene Fressati Cardoso, Patrícia Barco, Bety Chen, Vladimir Tavares, Fabiana Cristina Pereira, Francisco José Forestiero, Leticia Cecon, Marília Reis Gonçalves Rocha, André Ducat Luchessi, Carlos Eduardo de Melo, Simone Cohen Sorkin e Hamilton Massayuki Hinuy, com os quais repartí os momentos de alegria a cada experimento bem-sucedido, que conviveram comigo, que contribuíram, cada um a sua maneira, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Às secretárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ana Maria Dantas, Sueli Providelo e Márcia Cristina

Caramico; e da Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Elaine Midory Ychico, Benedita Espírito Santo de Oliveira e Jorge Alves Lima pelo auxílio profissional.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Cláudia Luciano dos Reis, Carmem Lúcia Moura e Maria Dorlei Moura.

A todos os amigos que de algum modo incentivaram e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas.....	02
Resumo.....	04
Abstract.....	05
1. Introdução.....	06
1.1. Aterosclerose e hipercolesterolemia.....	06
1.2. Terapêutica nas hipercolesterolemias.....	08
1.3. Vastatinas.....	15
1.4. Farmacocinética das vastatinas.....	18
1.5. Genes envolvidos na resposta terapêutica as vastatina.....	24
1.5.1. Genes da CYP3A.....	27
2. Objetivos.....	34
3. Casuística e Protocolo terapêutico.....	35
3.1. Casuística.....	35
3.2. Protocolo terapêutico.....	37
4. Material e Métodos.....	38
5. Resultados.....	58
6. Discussão.....	84
7. Conclusões	92
8. Referências bibliográficas.....	93
9. Anexos.....	114
9.1 . Dados biodemográficos e laboratoriais individuais.....	114
9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	119

Lista de Abreviaturas

A	adenina
AFCAPS/TexCAPS	<i>Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ALT	alanina aminotransferase
apo	apolipoproteína
apo A-I	apolipoproteína A-I
apo A-IV	apolipoproteína A-IV
apo B	apolipoproteína B
apo E	apolipoproteína E
AST	aspartato aminotransferase
7-BFC	7-benziloxi-4-(trifluorometil)coumarin
bp	pares de bases
C	citocina
CARE	<i>The Cholesterol and Recurrent Events Study</i>
CETP	proteína de transferência do colesterol esterificado
CK	creatina quinase
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Estudo 4S	<i>Scandinavian Simvastatin Survival Study</i>
FDB	<i>Familial defective apolipoprotein B-100</i>
G	guanina
γ -GT	gama-glutamil transferase
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol da HDL
HF	Hipercolesterolemia Familiar

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IAM	infarto agudo do miocárdio
kb	kilobases
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol da LDL
LIPID	<i>Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease</i>
PA	pressão arterial
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RLDL	receptor da lipoproteína de baixa densidade
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
SDS	dodecil sulfato de sódio
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSCP	polimorfismo de conformação de fita simples
T	timina
TG	triglicérides
V	volts
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	colesterol da VLDL
WOSCOPS	<i>West of Scotland Coronary Prevention Study</i>

RESUMO

As vastatinas são inibidores da enzima HMG-CoA redutase que revolucionaram o tratamento e a prevenção das doenças isquêmicas e coronarianas. A resposta as vastatinas é influenciada por inúmeros fatores, incluindo determinantes ambientais e genéticos, como proteínas variantes envolvidas no metabolismo lipídico e na biodisponibilidade de fármacos. CYP3A4 é a isoenzima mais abundante do citocromo P450 no fígado de humanos adultos e é de extrema importância no metabolismo de muitos fármacos, incluindo as vastatinas. A grande variabilidade na expressão da CYP3A4 entre os indivíduos pode ter alto impacto na eficácia de tratamentos farmacológicos. Para investigação da importância das variantes da CYP3A4 na resposta a atorvastatina, o gene CYP3A4 foi rastreado para mutações em 63 indivíduos brancos e 25 negros, brasileiros, sem vínculo familiar, com hipercolesterolemia primária, bem como 32 indivíduos brancos com hipercolesterolemia familiar, tratados com atorvastatina (10mg/dia/4sem e 20 mg/dia/4sem). O promotor, 13 éxons e as seqüências flanquedoras dos introns do gene CYP3A4 foram rastreados por PCR-SSCP e por sequenciamento de DNA. Foram detectadas a mutação *missense* R162Q (alelo CYP3A4*15A) no éxon 6 e uma mutação nova, no intron 7 (15752insG). Encontrou-se também uma mutação silenciosa (c.1134A>G) e cinco mutações *missense* novas (L373V, E374A, D380A, S398I, A403H) no éxon 11. As freqüências das mutações no éxon 6 foram 0,060 e 0,000 em negros e brancos, respectivamente, enquanto as freqüências das mutações do éxon 11 variaram de 0,040 a 0,060 e de 0,008 a 0,016 em negros e brancos, respectivamente. As freqüências do alelo CYP3A4*1B da região promotora e da variante no intron 7 foram de 0,056 e 0,380 em indivíduos brancos e negros, respectivamente. Foi observada associação entre essas duas variantes. Após tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4sem), indivíduos portadores dos alelos CYP3A4*1B ou CYP3A4*15 e da mutação no intron 7 tiveram resposta similar aos portadores do alelo comum. Por outro lado, portadores de mutações no éxon 11 tiveram maior redução (53%) nas concentrações de LDL-C do que os sem mutações neste éxon (38%). Esses resultados indicam que as mutações no éxon 11 do gene CYP3A4 podem estar associadas com maior resposta a atorvastatina em indivíduos hipercolesterolêmicos brasileiros. Portanto, a identificação de variantes da CYP3A4 podem contribuir para estabelecer o perfil farmacogenético de pacientes tratados medicamentos hipolipemiantes.

ABSTRACT

Statins are HMG-CoA reductase inhibitors that have revolutionized the treatment and prevention of coronary heart diseases. The response to statins is influenced by a number of factors, including environment and genetic determinants, such as variants of proteins involved in lipid metabolism and drug bioavailability. CYP3A4 is the most abundant isoenzyme of cytochrome P450 in adult human liver and plays a pivotal role in the metabolism of many drugs, including some statins. The large variability of CYP3A4 expression among individuals may have a strong impact on the efficacy of drug treatment. In order to investigate the role of CYP3A4 variants in response to atorvastatin, CYP3A4 gene was screened for mutations in 63 white and 25 black unrelated Brazilian individuals with primary hypercholesterolemia and in 32 white familial hypercholesterolemic treated with atorvastatin (10mg/d/4w and 20 mg/d/4w). The promoter, 13 exons and the flanking intron sequences of the CYP3A4 gene were screened by PCR-SSCP analysis and by DNA sequencing. We found one missense mutation (R162Q, CYP3A4*15A allele) in exon 6 and one new intronic mutation in intron 7 (15752insG). We also found one novel silent (c.1134A>G) mutation and five novel missense (L373V, E374A, D380A, S398I, A403H) mutations in exon 11. Frequencies of mutations in exon 6 were 0.060 and 0.000, in black and white individuals, respectively, while frequencies of exon 11 mutations varied from 0.040 to 0.060 and from 0.008 to 0.016 in blacks and whites, respectively. Frequencies of the CYP3A4*1B allele (promoter region) and intron 7 variant were 0.056 and 0.380 in white and black subjects, respectively. An association between both variants was found. After treatment with atorvastatin (10mg/d/4w), individuals carrying CYP3A4*1B or CYP3A4*15 alleles and the novel 7 intronic mutation have similar therapeutic response to those with common allele. On the other hand, carriers of the exon 11 mutations have higher reduction (53%) of LDL-C levels than the non-carriers (38%) indicating that mutations in exon 11 of the CYP3A4 gene maybe associated with higher response to atorvastatin in Brazilian hypercholesterolemic individuals. Therefore, the identification of the CYP3A4 variants may contribute to the pharmacogenetic profile of patients treated with lowering-lipid drugs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose e Hipercolesterolemia

A aterosclerose é uma doença de evolução lenta e progressiva que apresenta índices de morbidade e mortalidade alarmantes em todo mundo. Constitui um grave problema de Saúde Pública tanto para países desenvolvidos como os Estados Unidos, Finlândia e Inglaterra, como para países em desenvolvimento, como o Brasil (Lotufo, 1997).

Vários são os fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento da aterosclerose, em especial, a doença arterial coronariana (DAC). Esses fatores podem ser ambientais, tais como, dieta, sedentarismo, tabagismo, entre outros, bem como genéticos que incluem histórico familiar, dislipidemia, hipertensão, *Diabetes Melitus*, entre muitos outros. As dislipidemias, em especial a hipercolesterolemia, constituem um fator de risco indiscutível para as complicações cardiovasculares de natureza aterosclerótica (Simons, 1986; Kannel *et al.*, 1979; Stamler *et al.*, 1986).

A associação entre o aumento do colesterol plasmático e a predisposição à aterosclerose em humanos, foi sugerida pela primeira vez, em 1938, por Thanhauser e Muller. Iniciado no final da década de 40, o estudo de Framingham demonstrou que os valores de colesterol total (CT), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) se prestam como indicadores de risco no surgimento da doença aterosclerótica (Castelli, 1984). Outro estudo bastante expressivo, por envolver 360.000 indivíduos com seguimento de 6 anos, foi o *Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*, iniciado na década de 80, nos Estados Unidos (Stamler *et al.* 1986). De acordo com o MRFIT, o risco de morte por DAC aumenta significativa e progressivamente

para concentrações plasmáticas de colesterol total superiores a 182 mg/dL. Assim, dos 35 aos 57 anos, a mortalidade por DAC variou de 202,4/100.000 habitantes para valores de colesterol total inferiores a 182 mg/dL para 830,9/100.000 habitantes para concentrações de colesterol total superiores a 245 mg/dL, com um risco relativo de 2,4 (Stamler *et al.*, 1986).

Outros dois estudos também se destacaram na associação da hipercolesterolemia com elevada incidência de DAC: o Estudo do Sete Países e o Estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS). O primeiro demonstrou que a freqüência de coronariopatia se relaciona com colesterolemia total elevada e com dietas alimentares ricas em gorduras e colesterol, em 11.000 indivíduos de cidades do Japão, Holanda, Finlândia e Estados Unidos com (Keys, 1970). O Estudo da OMS mostrou que os índices de mortalidade por DAC se correlacionavam diretamente com as concentrações médias de colesterol e HDL-C das populações de 27 países estudados (Simon, 1986).

Estudos mais recentes avaliaram indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com vastatinas para prevenção primária (WOSCOPS e AFCAPS/TexCAPS) ou secundária (4S, CARE e LIPID) de eventos coronarianos (Shepherd *et al.*, 1995; Downs *et al.*, 1998; The Scandinavian Simvastatin Survival Study group, 1994; Sacks *et al.*, 1996; The LIPID study group, 1998). Esses estudos mostraram que a redução da colesterolemia estava associada com a diminuição dos eventos coronarianos e/ou mortalidade.

Assim, mais de 60 anos de estudo da hipercolesterolemia, demonstraram inequivocamente que esta condição é fator de risco importante para o desenvolvimento da doença aterosclerótica e que a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol constituem prevenção importante de risco aterosclerótico.

1.2. Terapêutica nas hipercolesterolemias

No tratamento da hipercolesterolemia, a orientação inicial é sempre dietética, sendo que a necessidade posterior de terapia medicamentosa não exclui a manutenção permanente de dieta alimentar. A orientação dietética é feita através da restrição de alimentos ricos em colesterol, do uso de proporções adequadas de gorduras saturadas, monoinsaturadas e poliinsaturadas, bem como da maior ingestão de fibras. É importante ressaltar que a orientação dietética fornece resultados excelentes no tratamento da hipertrigliceridemia, porém ela proporciona respostas muito precárias para a redução da hipercolesterolemia. Assim, a constatação de concentrações de LDL-C superiores a 160 mg/dL após restrição dietética, justifica a utilização de medicamentos hipocolesterolemiantes associados à dieta pobre em gordura saturada e colesterol (Giannini, 1998).

Os fármacos utilizados no tratamento da hipercolesterolemia são as vastatinas, fibratos, resinas seqüestrantes de ácidos biliares, ácido nicotínico e seus derivados e probucol (Giannini, 1998; Diretrizes..., 2001).

As vastatinas são um grupo de princípios ativos que inibem a ação da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, enzima chave na biossíntese intracelular de colesterol, por constituir etapa limitante do processo (Vaughan, 1996). Como consequência da inibição dessa enzima há diminuição da síntese de colesterol. Desse modo, as quantidades intracelulares de colesterol diminuem, o que estimula a transcrição e a síntese de receptores de LDL (RLDL). O maior número de receptores de LDL na superfície celular proporciona maior captação das partículas de LDL circulantes, o que diminui a colesterolemia e restabelece a homeostase intracelular de colesterol (**Figura 1**) (Lennernäs & Fager, 1997; Vaughan *et al.*, 2000).

As vastatinas reduzem o LDL-C de 20-55%, dependendo da dose e da vastatina utilizada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998). Hoje, já estão sendo disponibilizadas vastatinas mais potentes, que proporcionam maiores reduções da hipercolesterolemia, com doses mais baixas.

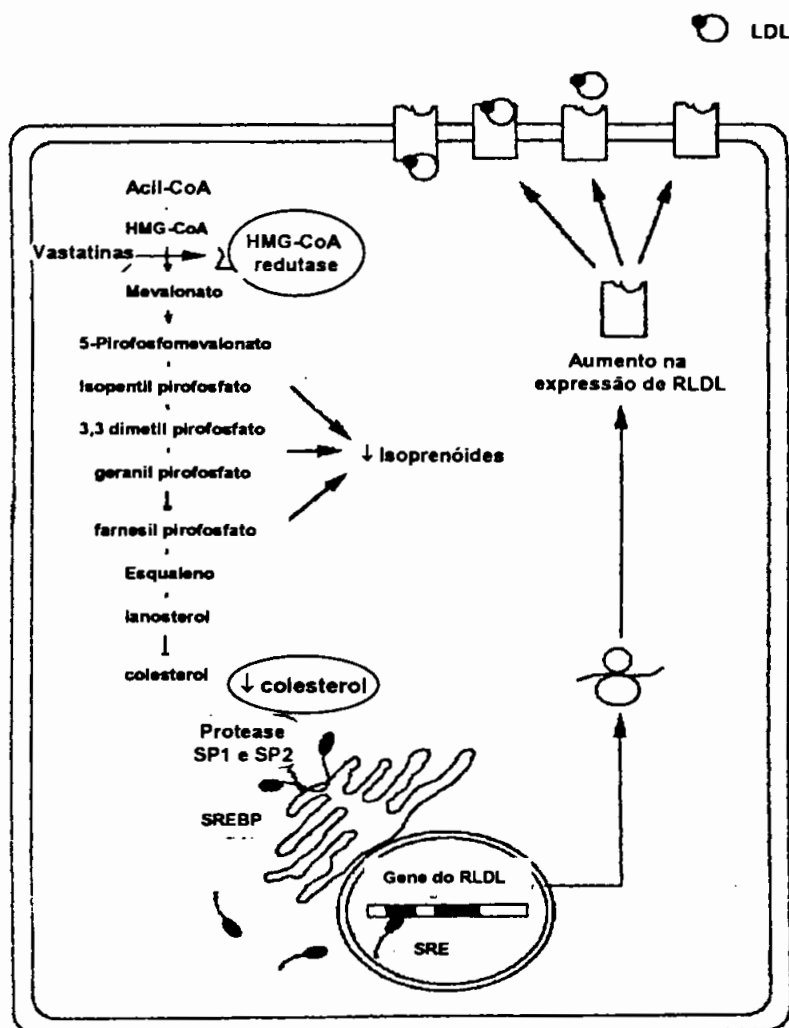


Figura 1. Regulação da síntese intracelular de colesterol. A inibição da HMG-CoA redutase por ação das vastatinas reduz as concentrações intracelulares de colesterol, o que ativa as proteases SP1 e SP2, as quais promovem a clivagem das *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) no retículo endoplasmático. As SREBPs são transportadas para o núcleo da célula, onde estimulam a expressão de receptores de LDL (RLDL), pela ligação aos *sterol regulatory element* (SRE), localizados na região promotora do gene do RLDL. A expressão elevada de RLDL aumenta a endocitose da LDL mediada por receptor, que diminui as concentrações de LDL plasmática. A inibição da HMG-CoA redutase também reduz as concentrações intracelulares de isoprenóides, intermediários da biossíntese de colesterol. Adaptado de Vaughan *et al.*, 2000.

Outros efeitos benéficos das vastatinas, denominados efeitos pleiotrópicos, também contribuem na prevenção de eventos coronarianos (LaRosa, 2001). Esses efeitos promovem principalmente estabilização da placa aterosclerótica por diminuir a oxidação da LDL e a avidéz do macrófago pela LDL oxidada (Avariam *et al.*, 1992); redução da expressão vascular de moléculas de adesão (Kimura *et al.*, 1997; Lehr *et al.*, 1993); inibição da proliferação e migração de células musculares lisas (Rogler *et al.*, 1995; Negre-Aminou *et al.*, 1997); modificação bioquímica das funções endoteliais, transformando o endotélio de predominantemente protrombótico e vasospástico em vasoresistente e vasodilatado (Liao *et al.*, 1995); inibição da biossíntese de isoprenóides e como consequência, diminuição da geração de anions superóxido por atenuar a isoprenilação da NADPH oxidase (Bokoch & Prosanitz, 1992; Chen *et al.*, 1997) (**figura 1**); e finalmente, ação anti-trombótica, por reduzir a reatividade plaquetária (Notarbartolo *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1992; Lacoste *et al.*, 1995).

O potente efeito redutor de LDL plasmática das vastatinas faz com que sejam os fármacos de primeira escolha no tratamento da hipercolesterolemia. As vastatinas em uso no Brasil são: lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina e atorvastatina. Outras duas vastatinas, rosuvastatina e pitavastatina se encontram em fase final de testes clínicos com seres humanos e em breve estarão disponíveis para uso de pacientes hipercolesterolêmicos.

Os estudos de prevenção primária WOSCOPS e AFCAPS/TextCAPS e de prevenção secundária 4S, CARE e LIPID, que utilizaram vastatinas para a reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol, demonstraram que esta classe de medicamentos apresenta poucos efeitos adversos, que somam cerca de 2%.

Os efeitos adversos mais importantes são de natureza muscular, manifestado por mialgia e/ou elevação da enzima creatina quinase (CK), e as de natureza hepática, podendo haver elevação das enzimas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), com raríssimos casos de hepatite tóxica. A elevação nas concentrações de

enzimas hepática (maior que três vezes o limite superior) é dose dependente (Farmer & Gotto, 1996; Malinowski, 1998). O risco de miopatia é aumentado quando há associação das vastatinas com fibratos, ácido nicotínico ou ciclosporina (Vaughan *et al.*, 2000). Outros efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais (flatulência, constipação e dispepsia), dores de cabeça e insônia também podem ser relatados durante a terapia com vastatinas (Malinowski, 1998).

Os resultados de estudos de eficácia das vastatinas para a prevenção de eventos ateroscleróticos fatais ou não-fatais estão resumidos no **Quadro 1**.

Quadro 1. Resumo dos resultados dos cinco principais estudos de intervenção clínica com vastatinas em eventos coronarianos.

Estudo	Descrição do estudo	Dura- ção (anos)	Redução			Referências
			LDL-C (%)	Mortali- dade (%)	Morte por DAC (%)	
4S	4.444 indivíduos HC, DAC, Sinvastatina 10-40 mg/dia	5,0	35	30	42	The 4S group, 1994
WOSCOPS	6.595 indivíduos HC, sem DAC, Pravastatina 40 mg/dia	4,9	26	NS	33	Shepherd et al., 1995
CARE	4.159 indivíduos NC, DAC, Pravastatina 40 mg/dia	5,0	28	NS	19	Sacks <i>et al.</i> , 1996
AFCAPS	6.605 indivíduos NC, sem DAC, Lovastatina 20-40 mg/dia	5,2	25	ND	36	Downs et al., 1998
LIPID	9.014 indivíduos NC, DAC, Pravastatina 40 mg/dia	6,1	25	22	24	The LIPID study group, 1998
Heart Propention Study	5963 indivíduos diabéticos e 14573 indivíduos com DAC não-diabéticos. Sinvastatina 40mg/dia	4,8	ND	ND	27	The HPS Collaborativ e Group

HC = hipercolesterolêmico; NC = normocolesterolêmico; DAC = doença arterial coronariana; NS = não significativo; ND = não disponível. Adaptado de Vaughan *et al.*, 2000.

Os fibratos constituem um grupo de substâncias que têm seus efeitos mais pronunciados na redução das lipoproteínas ricas em triglicérides, porém que também exercem algum efeito na diminuição das LDL circulantes. Adicionalmente, os fibratos diminuem a quantidade de LDL pequenas e densas e aumentam o HDL-C. Sua utilização para o tratamento da hipercolesterolemia se limita, porém, aos pacientes que não respondem a vastatinas e/ou aos seqüestrantes de ácidos biliares (Betteridge, 1993). Os princípios ativos da classe dos fibratos são: bezafibrato, gemfibrozil, etofibratos, fenofibrato e cipofibrato.

A ação dos fibratos se explica pela ligação dos mesmos aos *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs). Os PPARs são membros de uma família de receptores nucleares de fatores de transcrição específicos, e podem ser do tipo alfa, beta/delta ou gama. A ligação dos fibratos ao PPAR α induz a ativação ou a inibição de múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico pela ligação do PPAR α ativado aos *peroxisome proliferator response elements* (PPRE), localizados na região promotora dos genes (Fruchart *et al.*, 1999).

Os fibratos reduzem as concentrações plasmáticas de triglicérides (TG) alterando a expressão de inúmeros genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos, tais como proteína transportadora de ácidos graxos (FATP), acil-CoA sintetase, e outros, além de promover aumento na síntese de lipase lipoprotéica e diminuição da síntese de apolipoproteína CIII (apo CIII).

O uso de fibrato proporciona redução média de TG entre 35 e 50%, podendo chegar a 70% em alguns casos. Os fibratos elevam as concentrações de HDL em até 25%, pelo aumento na síntese das apolipoproteínas AI (apo AI) e AII (apo AII) (Fruchart *et al.*, 1999; Staels & Auwerx, 1998). Além desses efeitos, os fibratos também promovem a redução da produção de apolipoproteína B (apo B) e colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) (Lamb *et al.*, 1993). A resposta da colesterolemia à ação dos fibratos é pequena, com médias de redução de colesterol total que variam entre 8 e 15% (Giannini, 1998).

Os fibratos geralmente são bem tolerados, mas podem determinar distúrbios gastrintestinais (diarréia, dores abdominais, náuseas), tonturas, cefaléia, prurido, urticária, diminuição da libido e, excepcionalmente, dores musculares e até miosite. Esses efeitos adversos aparecem em 5% dos casos. Elevações de enzimas hepáticas e musculares e da creatinina são raras, mas seu uso não é aconselhável em indivíduos portadores de hepatopatias (Giannini, 1998).

Os seqüestrantes de ácidos biliares são resinas como a colestiramina e o colestipol, porém este último não é comercializado no Brasil (Giannini, 1998). Um novo representante desta classe, que está para ser lançado, é colesevelam, mais potente, com menor incidência de efeitos colaterais e menor interação medicamentosa que a colestiramina (Thompson, 2003).

As resinas quando ingeridas, se ligam aos ácidos biliares no intestino, impedindo sua reabsorção. Assim, os ácidos biliares são eliminados em maior quantidade pelas fezes. Com a diminuição da taxa de reabsorção dos ácidos biliares através do ciclo êntero-hepático, há maior conversão de colesterol endógeno em ácidos biliares, por aumento da atividade da enzima colesterol 7 α -hidroxilase, diminuindo o colesterol hepático (Einarsson *et al.*, 1991). Concentrações diminuídas de colesterol intracelular estimulam a transcrição e síntese de receptores de LDL, tornando-os mais abundantes na superfície celular e proporcionando maior taxa de interiorização das LDL circulantes e sua conseqüente diminuição no plasma (Einarsson *et al.*, 1991; Shepherd, 1989).

A colestiramina não é absorvida pelo intestino, tendo ação exclusivamente na luz intestinal, razão pela qual não determina efeitos sistêmicos. Não é indicada em indivíduos portadores de doenças renais. Seus efeitos adversos são principalmente de origem gastrintestinal, como náuseas, flatulência e dores abdominais (Giannini, 1998).

A redução do LDL-C na terapia com resinas pode chegar a 30%, porém o uso de colestiramina pode determinar elevações de TG plasmáticos, que podem chegar a 20%. Normalmente as resinas são

utilizadas em pacientes para os quais o uso das vastatinas não é recomendável, como gestantes, crianças, mulheres em período de amamentação e mulheres férteis que não estão em uso de contraceptivos, além de indivíduos que não apresentaram resultados satisfatórios de redução de LDL-C com as vastatinas (Giannini, 1998).

O ácido nicotínico, um derivado da niacina, é um hipolipemiante que age impedindo a hidrólise de triglicerídeos nos adipócitos, diminuindo a liberação de ácidos graxos na circulação. O menor aporte de ácidos graxos para os hepatócitos, proporciona síntese diminuída de VLDL com conseqüente diminuição na formação de LDL. Promove ainda elevação de HDL-C por mecanismos desconhecidos. É utilizado no tratamento da hipercolesterolemia quando os fármacos das classes referidas anteriormente não podem ser utilizados, como nos indivíduos com doenças hepáticas e renais, em mulheres gestantes e crianças (Giannini, 1998).

A sua utilização restrita na terapia hipolipemiante decorre de seus acentuados efeitos colaterais, como prurido difuso, sensação de acentuado calor facial, eritema cutâneo, arritmias cardíacas, entre outros. Esses efeitos surgem freqüentemente da utilização de doses terapêuticas elevadas, as quais são necessárias para reduções de LDL de até 30% (Giannini, 1998; Organização Mundial da Saúde, 1998).

O probucol é um fármaco com efeito antioxidante, que reduz a oxidação das partículas de LDL, diminuindo a captação das mesmas por macrófagos na parede arterial. Está indicado nos casos de dislipidemias familiares, onde os pacientes são portadores de xantomas, pois contribui para a redução dessas lesões (Giannini, 1998).

O ezetimibe é o primeiro fármaco hipolipemiante que inibe seletivamente a absorção de colesterol no intestino. Em esquema de monoterapia, o ezetimibe mostrou reduções de LDL-C de até 20% e podendo ser usado de forma segura em combinação com outros

medicamentos hipolipemiantes (Iglesias & Diez, 2003; Davidson, 2003). O ezetimibe pode ser útil em pacientes com predisposição a efeitos adversos causados por outros hipolipemiantes, bem como pode ser utilizado em combinação com estes mesmos agentes, permitindo a utilização de doses menores dos mesmos (vastatinas, fibratos, niacina e outros), porém atingindo efeito equivalente na redução das concentrações de LDL-C (Jeu & Cheng, 2003).

1.3. Vastatinas

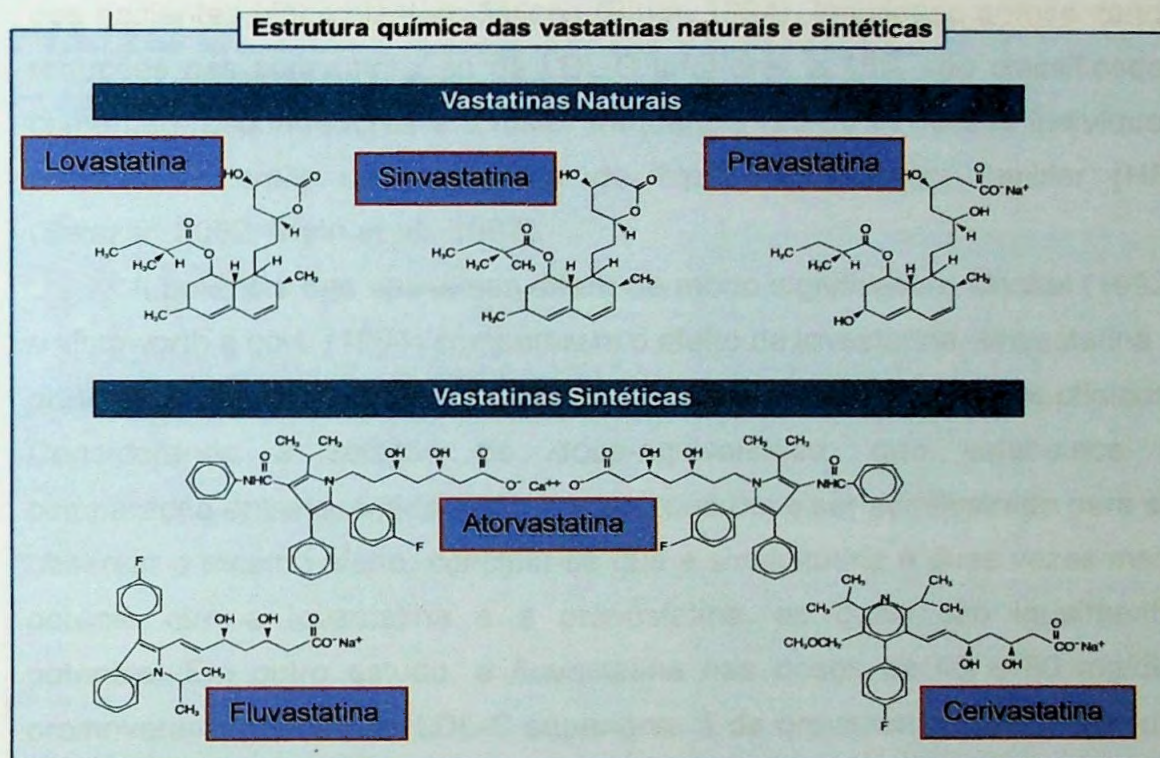
As vastatinas foram introduzidas na prática clínica no final da década de 80, após a descoberta de seus efeitos hipolipemiantes em 1976, quando Endo e cols. (Endo *et al.*, 1976) isolaram um composto do *Penicillium citrinum*, a mevastatina, com propriedade de inibir a atividade da HMG-CoA redutase em ratos. Desde então, foi observado que outros compostos (cetoconazol e outros) também são inibidores da HMG-CoA redutase (Moghadasian, 1999).

As vastatinas são classificadas como naturais ou sintéticas (**figura 2**), de acordo com a fonte de obtenção de cada uma. Entre as vastatinas naturais podemos citar a lovastatina, sinvastatina e pravastatina que são derivadas do fungo *Aspergillus terreus* (Alberts *et al.*, 1980). Enquanto a lovastatina é um produto natural, a sinvastatina e a pravastatina são produzidas em processo semi-sintético. A sinvastatina é o 2,2 dimetil-butirato análogo da lovastatina, e assim como esta última é um pró-fármaco. A pravastatina é um metabólito ativo da mevastatina e que foi descoberta na urina de animais tratados com mevastatina. Ao contrário da lovastatina e sinvastatina, a pravastatina é administrada na forma de sal sódico do seu ácido ativado (McTavish & Sorkin, 1992) (**figura 2**).

As vastatinas sintéticas, como a fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina e pitavastatina apresentam estrutura distinta dos inibidores HMG-CoA redutase derivados de fungos (**figura 2**). A estrutura

fluorofenil-indol da fluvastatina mimetiza a coenzima A (Blum, 1994; Kajinimi *et al.*, 2003; Bousquet & Gayet, 2003) (**figura 2**).

A. Estrutura química das vastatinas naturais e sintéticas



B. Estrutura química de novas vastatinas

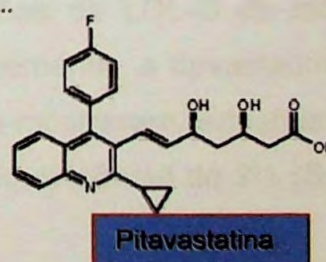
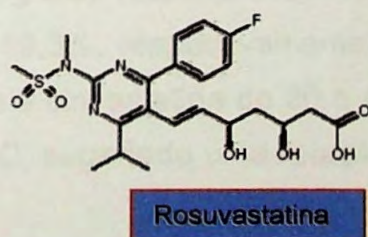


Figura 2. A. Estrutura química das vastatinas naturais e sintéticas. B. Estrutura química das vastatinas sintéticas mais recentemente lançadas. Adaptado de Christians *et al.*, 1998 e Iglesias & Diexz (2003).

O potente efeito hipolipemiante das vastatinas foi estabelecido baseando-se em um grande número de estudos controle-placebo. Esses estudos mostraram que as vastatinas produzem redução dose-dependente

das concentrações de LDL-C que podem chegar a 60% (Hsu *et al.*, 1995; Illingworth *et al.*, 1994; Blum, 1994; Nawrochi *et al.*, 1995; Farnier & Davignon, 1998). Reduções de 20 a 30%, porém são mais típicas com as doses comumente utilizadas na prática clínica para o tratamento da maioria dos pacientes hipercolesterolêmicos (Blum, 1994). Indivíduos apresentando reduções nas concentrações de LDL-C inferiores a 15% são classificados como não-respondedores e a maior frequência (20-30%) desses indivíduos encontra-se entre os portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) (Salazar, 2002; Stein *et al.*, 1997).

A potência das vastatinas difere de modo significativo. Mitchel (1992) e Illingworth e cols. (1994) compararam o efeito da lovastatina, sinvastatina e pravastatina sobre a concentração de LDL-C em diferentes estudos clínicos. Considerando a relação de dose-equivalência, que estabelece a comparação entre quantidade de fármaco que deve ser administrado para se observar o mesmo efeito, concluiu-se que a sinvastatina é duas vezes mais potente que a lovastatina e a pravastatina, as quais são igualmente potentes. Em outro estudo, a fluvastatina nas doses de 40 e 80 mg/dia promoveram redução de LDL-C superiores à da pravastatina nas doses de 20 e 40 mg/dia, sugerindo relação dose-equivalência entre 2:1 e 1:1 (Jacotot *et al.*, 1995). Em outra comparação direta, fluvastatina e lovastatina (ambas de 20 mg/dia) reduziram as concentrações de LDL-C de maneira similar (20,5 e 19,3%, respectivamente). Recentemente, a fluvastatina de 40 e 80 mg/dia e a sinvastatina de 20 e 40 mg/dia mostraram reduções comparáveis de LDL-C, sugerindo uma relação dose-equivalência de 2:1 (Schulte & Beil, 1996).

A atorvastatina tem efeito mais potente que as demais vastatinas na redução da LDL-C, disponíveis até o momento (Cilla *et al.*, 1996; Black *et al.*, 1998). Em estudo com doses diárias de atorvastatina de 2,5 a 80 mg durante 6 semanas, observou-se reduções de LDL-C de 25% a 61%, respectivamente. A redução da LDL-C é acompanhada de reduções significativas também de CT, TG e apo B (Nawrocki *et al.*, 1995; Bakker-Arkema *et al.*, 2000).

Outras duas vastatinas que estão sendo disponibilizadas para a terapia hipocolesterolemizante são a rosuvastatina e a pitavastatina, também chamadas de super-vastatinas. A rosuvastatina é relativamente hidrofílica e possui menor propensão à toxicidade muscular e a interações com outros medicamentos. A pitavastatina tem alta biodisponibilidade quando administrada por via oral e mínima propensão a interações com fármacos metabolizados via citocromo P450. A rosuvastatina é a mais potente entre as vastatinas, enquanto a pitavastatina apresenta efeito similar à da atorvastatina (Iglesias & Diez, 2003).

Um dos estudos mais recentes, o STELLAR* Trial, analisou 2431 pacientes portadores de hipercolesterolemia, que foram tratados com 10 a 80 mg de atorvastatina, sinvastatina ou rosuvastatina, ou com 10 a 40 mg de pravastatina. Após 6 semanas de tratamento, observou-se que a administração de rosuvastatina promoveu redução de LDL-C 8,2% maior, em média, do que o tratamento com atorvastatina, 26% maior que a pravastatina e 18% que a sinvastatina. Observou-se também elevação média nas concentrações de HDL-C de 7,7% a 9,6% entre os indivíduos em tratamento com rosuvastatina enquanto que para as outras vastatinas essa média variou entre 2,1% a 6,8% (Jones *et al.*, 2003).

1.4. Farmacocinética das vastatinas

Apesar das vastatinas apresentarem o mesmo mecanismo farmacológico, suas propriedades farmacocinéticas apresentam algumas diferenças.

As vastatinas são clinicamente usadas em formulações orais de liberação imediata. Normalmente, a absorção das vastatinas no intestino é dependente da relação dose/dissolução, taxa de dissolução, degradação/metabolismo no lúmen, trânsito intestinal e permeabilidade efetiva através da mucosa intestinal (Lennernäs & Fager, 1997). Durante a absorção intestinal, parte da vastatina absorvida sofre metabolização pelas enzimas do citocromo P450.

A maior fração das vastatina absorvidas cai na circulação sangüínea é distribuída aos tecidos na forma ligada a proteínas plasmáticas. O transporte das vastatinas para o interior das células ocorre passivamente pela membrana celular (Lennernäs & Fager, 1997)

As vastatinas são removidas do plasma pelo fígado, onde são biotransformadas pela ação de enzimas do citocromo P450. A maioria dos metabólitos das vastatinas é diretamente excretada pelo sistema biliar (Lennernäs & Fager, 1997). Sabe-se ainda que algumas vastatinas, como a fluvastatina, sofrem eliminação hepática pré-sistêmica (Lennernäs & Fager, 1997, Corsini *et al.*, 1999; Hamelin & Turgeon, 1998).

O citocromo P450 é uma grande família de hemeoproteínas que promovem o metabolismo de um grande número de xenobióticos e endobióticos. O tipo e a taxa de expressão dessas enzimas no fígado, determinam a resposta metabólica do indivíduo a um determinado composto químico. No homem, foram identificadas 3 famílias de genes que codificam enzimas do citocromo P450: CYP1, CYP2 e CYP3. Essas famílias de enzimas são responsáveis pela maior parte da metabolização de fármacos no fígado. As famílias, as respectivas subfamílias e as enzimas CYP450 são apresentadas no **quadro 2**.

Quadro 2: Famílias, subfamílias e enzimas componentes do citocromo P450 encontradas em humanos.

Família	Subfamília	Enzima
CYP1	CYP1A	1A1/1A2
CYP2	CYP2A	2A6
	CYP2B	2B6
	CYP2C	2C8/2C9/2C10/2C18
	CYP2D	2D6
	CYP2E	2E1
CYP3	CYP3A	3A4/3A5/3A7/3A43

Adaptado de Wrighton *et al.*, 1992

A enzima CYP2C9 é responsável pela biotransformação da fluvastatina, enquanto que a lovastatina, pravastatina, sinvastatina, atorvastatina e cerivastatina são metabolizadas preferencialmente pela enzima CYP3A4 (Lennernäs & Fager, 1997). Estudos *in vitro* mostraram moderada afinidade da enzima CYP2C8 pela fluvastatina e cerivastatina (Lennernäs & Fager, 1997; Bottorf, 1999; Corsini *et al.*, 1999).

A CYP2C9 hidroxila o anel indol da fluvastatina, nas posições 5 e 6 (**Figura 2A**). Essa reação promove a perda do grupo isopropil e a β -oxidação, gerando preferencialmente o metabólito ácido desisopropilpropionico-fluvastatina. Outra via de metabolização menos importante da fluvastatina gera outros três metabólitos: desisopropil-fluvastatina, 6-hidroxi-fluvastatina e 5-hidroxi-fluvastatina (Christians *et al.*, 1998). Esses metabólitos têm efeito farmacológico limitado e não contribuem para o efeito da fluvastatina. A maior parte desses metabólitos é encontrada nas fezes, decorrente de excreção biliar. Apenas 5% dos mesmos são encontrados na urina (Lennernäs & Fager, 1997; Bottorf, 1999; Corsini *et al.*, 1999).

A pravastatina é administrada na forma de anel hidroxi-ácido aberto (**Figura 2A**), e não depende de reação enzimática para se tornar farmacologicamente ativa. Uma das principais diferenças farmacocinéticas entre a pravastatina e as outras vastatinas é que a pravastatina é eliminada preferencialmente, na forma inalterada (aproximadamente 70%) (Christians *et al.*, 1998). Em menor extensão, porém, a pravastatina pode ser metabolizada por várias diferentes vias de biotransformação, envolvendo reações de isomerização, glicuronização, sulfatação, conjugação com glutatona e oxidação (Everett *et al.*, 1991; Kitazawa *et al.*, 1993; Muramatsu *et al.*, 1992). Existe ainda a via de metabolização da CYP3A4. Os metabólitos da pravastatina gerados nessa via são 3' α , 5 β '-dihidroxi-pravastatina e 3' α -hidroxi-pravastatina, formados no fígado pela ação da CYP3A4 e são excretados na urina. Sabe-se, porém, que essa via de biotransformação não é preferencial para a pravastatina (Kitazawa *et al.*, 1993).

A lovastatina é administrada na forma de pró-fármaco que é ativado por hidrólise, pela enzima CYP3A4, a hidróxi-ácido lovastatina, no fígado. Esse intermediário pode ser re-oxidado a lovastatina lactona, ou seguir a via de β -oxidação. Em camundongos, a via de β -oxidação da cadeia carbônica é predominante. Em humanos e caninos, a conversão para lovastatina lactona e subsequente metabolização pela CYP3A4 é a rota de biotransformação predominante. O mesmo processo metabólico ocorre para a sinvastatina, resultando em um metabólito principal, a 6' β -carboxi sinvastatina, entre 10 outros metabólitos (Lennernäs & Fager, 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que a metabolização da atorvastatina, realizada pela CYP3A4, resulta em dois metabólitos, orto-hidroxi e a para-hidroxi atorvastatina, ambos também apresentando efeito inibidor da HMG-CoA redutase (Christians *et al.*, 1998).

A comparação entre as propriedades farmacocinéticas das diversas vastatinas tradicionalmente utilizadas no Brasil está resumida no **Quadro 3**. Nesse quadro observa-se que a atorvastatina atinge pico máximo de concentração em até 3 horas, como a lovastatina e a sinvastatina, porém possui meia-vida de eliminação maior que todas as outras vastatinas (~15 horas) e a presença de seus metabólitos pode ser detectada no plasma por longos períodos de tempo (>24 horas) (Posvar *et al.*, 1996). Tal fato pode explicar a maior intensidade do seu efeito redutor de colesterol total e LDL-C, como descrito por Cilla *et al.* (1996). Observa-se também que a maior taxa de ligação às proteínas plasmáticas, faz com que a quantidade de fármaco livre seja muito pequena, diminuindo a disponibilidade farmacológica da droga ativa. Assim, o processo de metabolização é importante para atingir o efeito hipocolesterolêmico (Lennernäs & Fager, 1997).

Quadro 3. Comparação das propriedades farmacocinéticas dos inibidores da HMG-CoA redutase.

Propriedade	Atorvas- tatina	Fluvas- tatina	Lovas- tatina	Pravas- tatina	Sinvas- tatina
Dose (mg/dia)	10-80	20-80	20-80	20-40	10-40
Pro-fármaco	Não	Não	Sim	Não	Sim
Absorção					
Fração absorvida (%)	30	98	30	35	60-85
T _{max} (horas)	2-3	0,5-1,5	2-4	0,9-1,6	1,3-2,4
Biodisponibilidade (%)	12	10-35	<5	18	<5
Efeito do alimento	↓13%	↓15 ou ↑25%	↑50%	↓30%	0
Distribuição					
Ligação a proteínas (%)	98	98	>95	55-60	95
Lipofilicidade	Lipofílica	Hidrofílica	Lipofílica	Hidrofílica	Lipofílica
Metabolismo					
Metábolo sistêmico	Ativo	inativo	ativo	inativo	ativo
Principal enzima metabolizadora	CYP3A4	CYP2C9	CYP3A4	Nenhuma	CYP3A4
Eliminação Hepática (%)	98	95	70	71	<87
Excreção					
Excreção urinária (%)	Desprezível	6	10	20	13
Excreção fecal (%)	Predomi- nante	90	83	71	58
Meia-vida (horas)	15-30	0,5-2,3	2,9	1,3-2,8	2-3

Fontes: Malinowski *et al.*, 1998; Christians *et al.*, 1998; Corsini *et al.*, 1999.

A rosuvastatina depois de administrada por via oral é rapidamente absorvida e apresenta biodisponibilidade oral de aproximadamente 20%. Atinge pico de concentração plasmática em 3 horas, tem meia-vida de eliminação de aproximadamente 20 horas e apresenta alta taxa de ligação a

proteínas plasmáticas. É minimamente metabolizada via CYP2C9 e CYP2C19 a um metabólito N-desmetil com pequena atividade inibitória da HMG-CoA redutase. Aproximadamente 90% da dose de rosuvastatina administrada via oral é eliminada nas fezes e o restante é eliminado na urina (Carswell *et al.*, 2002; Iglesias & Diez, 2003).

Diferentemente da rosuvastatina, a pitavastatina apresenta biodisponibilidade oral aproximada de 80%, com pico de concentração plasmática em 50 minutos, meia-vida de eliminação de 11 horas e ligação a proteínas plasmáticas acima de 95%. É metabolizada via CYP2C9 e CYP2C8, minimizando a propensão de interação farmacológica entre os medicamentos metabolizados via CYP3A4 (Flores, 2002; Kajinami *et al.*, 2000; Iglesias & Diez, 2003).

Sabe-se que a CYP3A4 é responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos utilizados em humanos, além de substâncias endógenas como cortisol e estradiol, entre outros hormônios esteróides (Bottorff, 1999). Assim, a co-administração de fármacos que sejam metabolizados pela mesma via, ou que inibam a ação da CYP3A4, como itraconazol, benzodiazepínicos, eritromicina, ritonavir, carbamazepina, nifedipina, verapamil, entre outros, pode diminuir a biotransformação das vastatinas e elevar a ocorrência dos efeitos adversos já conhecidos das vastatinas (Moghadasian, 1999; Vaughan *et al.*, 2000; Christians *et al.*, 1998).

É importante observar ainda que, diferentemente das outras vastatinas, a pravastatina não apresenta problemas na co-administração de fármacos, já que sua via de metabolização principal não inclui as enzimas do citocromo P450. Entretanto, as interações farmacocinéticas não estão limitadas a co-administração da atorvastatina e outros medicamentos, mas também a produtos nutricionais como suco de *grapefruit*. Vários estudos (Ducharme *et al.*, 1995; Bailey *et al.*, 1995; Kufferschmidt *et al.*, 1995; Kufferschmidt *et al.*, 1998; Benton *et al.*, 1996), demonstraram que o suco de *grapefruit* aumenta a biodisponibilidade de diversos fármacos metabolizados pela CYP3A4 (Bottorff, 1999). Esse achado pode ser útil, quando se pretende melhorar o efeito das vastatinas sem alterar a dose administrada.

A CYP3A4 além de ser responsável pela metabolização das vastatinas e de vários outros xenobióticos e endobióticos, como mencionado anteriormente, ela apresenta alto grau de variabilidade interindividual da sua expressão hepática, porém pouco é conhecido sobre a base genética para esta expressão polimórfica (Linder *et al.*, 1997).

1.5. Genes envolvidos na resposta terapêutica as vastatinas

A resposta terapêutica as vastatinas é modificada por inúmeros fatores como idade, sexo, fatores relacionados a farmacocinética do medicamento e por determinantes genéticos (Hoffmann *et al.*, 2001). Mesmo em grupos homogêneos de pacientes, a resposta individual varia de modo significativo. Até o momento, não existem parâmetros clínicos ou bioquímicos que possam prever se a resposta ao tratamento com determinada vastatina será satisfatória ou se haverá o desenvolvimento de efeitos adversos, como a miosite e rabdomiólise em casos extremos. Os recentes avanços farmacogenéticos vêm permitindo o entendimento de vários mecanismos envolvidos no metabolismo das lipoproteínas e na resposta individual aos agentes hipocolesterolemiantes (Hoffmann *et al.*, 2001).

Mutações e polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo lipídico, como os genes do LDL, da apolipoproteína E (apo E), apo B, apo A-I e A-IV, da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), paraoxonase, lipase hepática foram associados às variações de resposta aos inibidores da HMG-CoA redutase em diferentes populações (Hoffmann *et al.*, 2001; Messer *et al.*, 2001; Zamboni *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2001; Turban *et al.*, 2001).

Recentemente, Bo *et al.* (2001) compararam a eficácia da atorvastatina e da sinvastatina para atingir as recomendações do *National Cholesterol Education Program* (NCEP, EUA), em 26 pacientes com HF heterozigótica (16 homens e 10 mulheres). Embora, a atorvastatina tenha

reduzido significativamente a concentração de LDL-C, somente 3 pacientes atingiram as metas do NCEP. Nenhum dos pacientes tratados com sinvastatina atingiu os valores recomendados pelo NCEP.

O tipo de mutação do gene do RLDL é um dos fatores que mais influenciam o efeito redutor das vastatinas nesses indivíduos portadores de HF. Assim, a caracterização da mutação é importante para indicar a dose necessária e o sucesso da terapia (Heath *et al.*, 1999).

Os polimorfismos do gene do RLDL também podem estar associados à resposta ao tratamento com as vastatinas, como é o caso dos polimorfismos *Avall* e *Pvull*, localizados no exon 13 e no intron 15 no gene do RLDL, respectivamente. Vários estudos demonstraram que indivíduos portadores dos alelos P2 e A- apresentavam melhor resposta ao tratamento com fluvastatina e atorvastatina, quando comparados aos indivíduos portadores dos alelos P1 e A+ (Salazar *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2000b; Salazar, 2002).

Além de alterações na região codificante do gene do RLDL, alterações na expressão do mesmo podem proporcionar variação na resposta ao tratamento com vastatinas. Salazar (2002) analisou a expressão do gene do RLDL e da HMG-CoA redutase antes e após 4 semanas de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina, e observou que indivíduos não-respondedores apresentavam expressão basal tanto do gene do RLDL como da HMG-CoA redutase inferiores aos dos indivíduos respondedores. Nesse estudo, os indivíduos que responderam ao tratamento tiveram maior expressão de RLDL e HMG-CoA redutase após o tratamento, o que não foi observado nos indivíduos não-respondedores. Essas observações sugerem que as alterações na expressão de ambos os genes podem resultar de defeitos genéticos dos fatores que regulam a transcrição desses genes, como as SREBPs, SCAPs e as proteases SP1 e SP2 (Salazar, 2002).

Em hipercolesterolêmicos portadores de mutações no gene da apo B, avaliou-se a resposta terapêutica a vastatinas que se mostrou similar a de indivíduos com outros tipos de hipercolesterolemia (Ejarque *et al.*, 2001). Tal observação se explica pela maior remoção de precursores de LDL que

contém apo E pelo RLDL, ou seja, como a presença da vastatina leva a maior expressão de RLDL na superfície celular, e essa maior quantidade de receptores promoverá a captação de precursores de LDL-C via apo E, o efeito hipocolesterolêmico da vastatina não é prejudicado pela deficiência na apo B. Além disso, como as concentrações de colesterol intracelular estão diminuídas, pelo menor influxo de colesterol nos hepatócitos e pela inibição da HMG-CoA redutase exercida pela vastatina, a síntese de VLDL e IDL estão também diminuídas (März *et al.*, 1993; Raal *et al.*, 1997; Brousseau *et al.*, 1995).

Guzmán e cols. (2000) avaliaram a influência do polimorfismo *Ins/Del* do gene da apo B em indivíduos hipercolesterolêmicos brasileiros tratados com fluvastatina. Observou-se que os indivíduos portadores do genótipo II apresentaram maiores reduções das concentrações de LDL-C (34%) quando comparados aos indivíduos portadores do alelo *Del* (27%). Por outro lado, Ojala e cols. (1991) não demonstraram a influência do polimorfismo *XbaI* na resposta a lovastatina (20 e 40 mg) em 211 indivíduos estudados.

Estudos associando o polimorfismo da apo E a resposta a tratamentos hipolipemiantes são conflitantes. O'Malley e cols. (1990), em estudo com 134 pacientes portadores de HF tratados com lovastatina (40 e 80 mg/dia), observaram que a resposta à terapia foi independente do genótipo da apo E. Ojala e cols. (1991) estudaram 78 portadores de HF e 154 portadores de hipercolesterolemia primária tratados com lovastatina (20 ou 40 mg/dia), durante 6 semanas. Os autores observaram significativa redução nas concentrações de LDL foi observada nos portadores do genótipo E3/4 quando comparada com os portadores do E3/3, nos indivíduos com hipercolesterolemia primária (não-HF) tratados com 20 mg e no CT dos portadores de HF tratados com 40 mg de lovastatina. Porém, não foi observada diferença na resposta ao tratamento, quando os mesmos indivíduos foram tratados por um maior período de tempo com 40 mg de lovastatina.

Do contrário, Salazar *et al.* (2001a), ao avaliar o efeito do polimorfismo do gene da apo E sobre a resposta terapêutica a atorvastatina

(10 mg/dia por 1 mês), em 25 pacientes brasileiros com HF heterozigótica, observou que os indivíduos portadores do genótipo E3/4 (n=10) apresentaram menor redução das concentrações de CT, LDL-C e apo B, quando comparados aos indivíduos com genótipos E2/3 e E3/3. Foi também verificada maior freqüência do alelo ϵ 4 nos indivíduos que não responderam ao tratamento.

Polimorfismos dos genes envolvidos na absorção intestinal de colesterol, os transportadores *adenosine triphosphate binding cassette transporter* A1 (ABCA1), G5 (ABCG5) e G8 (ABCG8), foram também associados à variabilidade da resposta as vastatinas (Miettinen & Gylling, 2001; Schaefer *et al.*, 2001; Lutucuta *et al.*, 2001).

Alterações em genes relacionados à hipertensão, como é o caso da enzima conversora de angiotensina (ECA), e à resposta inflamatória (IL-6, TNF-alfa e receptor CD14) também podem modificar a resposta terapêutica as vastatinas (Marian *et al.*, 2000; Elghannam *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Salazar *et al.*, 2001a; Schaefer *et al.*, 2001).

Genes relacionados a enzimas metabolizadoras das vastatinas (CYP3A4, CYP2C9), vêm sendo investigados também para que, no futuro, a indicação do tratamento hipocolesterolemiantes seja adequada à necessidade do paciente, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo os efeitos adversos (Hoffmann *et al.*, 2001).

1.5.1. Genes da subfamília CYP3A

Os membros da subfamília da CYP3A são hemoproteínas envolvidas no metabolismo de uma grande variedade de substratos endógenos e exógenos (Nelson *et al.*, 1996). Quatro genes que codificam enzimas dessa família foram descritos em humanos, a CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 (Nelson *et al.*, 1996) e recentemente, a CYP3A43 (Domanski *et al.*, 2001).

A CYP3A4 é a enzima de citocromo P450 mais abundante no fígado, enquanto a CYP3A7 é principalmente expressa no tecido hepático durante a

vida fetal, e já foi identificada na placenta e endométrio em mulheres adultas (Schetz *et al.*, 1994). A CYP3A5 é expressa nos rins, intestino e em quantidades variáveis no fígado de indivíduos adultos, em quantidades que variam de 10 a 30% das encontradas quantidades de CYP3A4 (Schetz *et al.*, 1994; Guengerich, 1999; Jounaïdi *et al.*, 1994). A CYP3A43 é expressa em pequenas quantidades, sendo detectada principalmente no fígado, rins, próstata e pâncreas (Domanski *et al.*, 2001). Apesar das diferenças na expressão, as enzimas da CYP3A são caracterizadas por elevada similaridade estrutural (Finta & Zaphiropoulos, 2000).

Os genes da CYP3A humana estão localizados em um agrupamento gênico no cromossomo 7q21-q22.1 (Brooks *et al.*, 1988; Spurr *et al.*, 1989). A CYP3A4 apresenta 95% de similaridade na seqüência nucleotídica e 97% na seqüência de aminoácidos com a CYP3A7. O gene da CYP3A5 apresenta menor similaridade com o da CYP3A4, resultando em uma identidade de 83% na seqüência polipeptídica. O gene da CYP3A43 apresenta região codificante de 1512 bp e similaridade de 84, 83 e 82% quando comparada às seqüências de cDNA da CYP3A4, 3A5 e 3A7, respectivamente (Westlind *et al.*, 1999). As seqüências de junção exon-intron da CYP3A4 e 3A7 são altamente conservadas entre os dois genes e, adicionalmente, a região de -1Kb proximal do promotor do gene da CYP3A7 tem similaridade de 91% quando comparado ao gene da CYP3A4 (Hashimoto *et al.*, 1993).

O gene da enzima CYP3A4 está localizado no cromossomo 7q22.1, tem aproximadamente 25 Kb de tamanho, apresentando 13 exons e 12 introns (Hashimoto *et al.*, 1993) e codifica um RNAm de 1,5 Kb e uma proteína com 503 aminoácidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> acesso 280107).

Apesar da alta identidade estrutural entre as isoenzimas da subfamília CYP3A, alguns estudos vêm demonstrando variações consideráveis na quantidade de enzima expressa e na atividade catalítica de cada uma. Como exemplo, a atividade da CYP3A4 em biopsias hepáticas variam em até 40 vezes (Shimada *et al.*, 1994; Westlind *et al.*, 1999).

Recentemente, vários estudos identificaram um receptor nuclear, o *pregnane X receptor* (hPXR) como sendo o principal ativador da transcrição dos genes da subfamília CYP3A (Bertilsson *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998). O hPXR sofre ativação de indutores das CYP3A, como rifampicina, fenobarbital e dexametasona, e a ativação transcricional envolve a formação de um heterodímero com o *retinoid X receptor* (RXR), o qual se liga a elementos responsivos de hPXR (Goodwin *et al.*, 1999). Esses elementos responsivos foram encontrados na região promotora proximal dos genes da CYP3A4 e CYP3A7 (Bertilsson *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998).

Desse modo, alterações genéticas presentes na região codificante ou na região regulatória dos genes da subfamília CYP3A, bem como nos fatores de transcrição envolvidos na expressão, podem ser responsáveis pela variabilidade na expressão ou atividade das enzimas codificadas por esses genes.

Nos últimos anos, o gene da CYP3A4 vem sendo mais estudado, por ser responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos utilizados na prática clínica, e por ser, dentre os membros da família da CYP3A, o predominantemente encontrado no fígado.

No gene da CYP3A4 foram identificados até o momento, 25 alelos diferentes decorrentes de 24 alterações genéticas, sendo que 5 dessas alterações estão presentes na região promotora 5' do gene e 19 estão distribuídas ao longo do gene. Entre essas mutações, 2 são do tipo inserção (alelo CYP3A4*15B, no exon 6 e alelo CYP3A4*6, no exon 9) e 17 são trocas de um único nucleotídeo (*SNP*) (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm>). Essas mutações foram encontradas e ao longo de todo gene CYP3A4, porém estão localizadas preferencialmente entre os éxons 5 e 7, bem como no éxon 11 (Lamba *et al.*, 2002) (Figura 3).

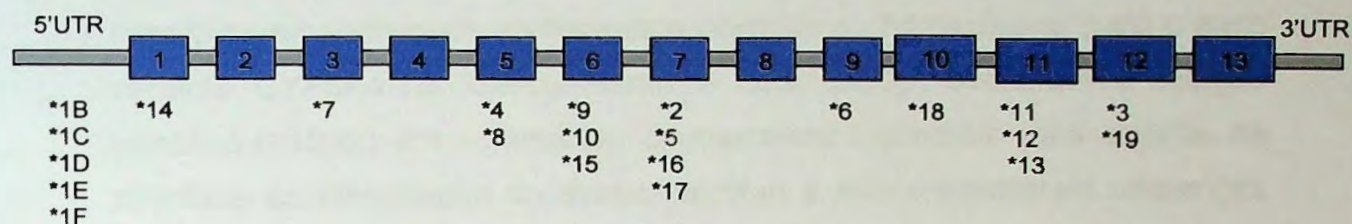


Figura 3. Distribuição das mutações encontradas no gene CYP3A4. Nomenclatura utilizada proveniente da página da Internet (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm>). Adaptado de Lamba *et al.*, 2002.

O primeiro polimorfismo encontrado no gene da CYP3A4 foi observado por Rebbeck e cols. (1998). Esse polimorfismo foi descrito como uma troca de uma única base (A→G) no nucleotídeo – 292 da região promotora 5' do gene da CYP3A4 (alelo CYP3A4*1B), que desorganiza a seqüência do sítio denominado *nifedipine-specific element* (NFSE), localizada entre os nucleotídeos –287 e –296 do gene. Supostamente, esta região do promotor é o local de ligação da nifedipina, a qual, uma vez ligada, ativa a transcrição do gene CYP3A4, porém sua importância para a variabilidade de expressão da CYP3A4 ainda é desconhecida (Ball *et al.*, 1999) Sabe-se que proteínas nucleares como os PXR, se ligam ao NFSE, porém o envolvimento dele na regulação transcricional é desconhecido (Hashimoto *et al.*, 1993).

Westlind e cols. (1999) mediram a hidroxilação da testosterona em microsomas obtidos de biópsias hepáticas de indivíduos portadores dos três genótipos do polimorfismo na região promotora 5' do gene da CYP3A4 e concluíram que a presença do alelo CYP3A4*1B não influencia a expressão da enzima CYP3A4 no fígado humano.

Vários estudos “in vivo” avaliaram a influência da variante alélica CYP3A4*1B na metabolização de fármacos. Ball e cols. (1999) avaliaram a taxa de metabolização dos substratos eritromicina e nifedipina em

voluntários sadios negros americanos e não observaram diferenças significantes na taxa média de dimetilação da eritromicina e na depuração da nifedipina em indivíduos homozigotos normais ou homozigotos para o alelo variante CYP3A4*1B. Garcia-Martin e cols. (2000) avaliaram a relação genótipo-fenótipo em voluntários caucasianos espanhóis pela análise da atividade de dimetilação do dextrometrofan e não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os indivíduos portadores dos 3 genótipos possíveis. Estudos com outros fármacos – ciclosporina, midazolam, entre outros - também não encontraram diferenças na resposta terapêutica entre indivíduos com diferentes genótipos do polimorfismo da região 5' promotora do gene CYP3A4 (Wandel *et al.*, 2000; von Ahnen *et al.*, 2001).

Publicações recentes têm mostrado diferenças interétnicas acentuadas na freqüência do alelo CYP3A4*1B, que varia de 0,0% em chineses americanos até 54,6% em negros americanos (Ball *et al.*, 1999). Para os Caucasianos a freqüência desse alelo tem variado entre 0,0% e 9,6% (Wandel *et al.*, 2000; Rebbeck *et al.*, 1998). No Brasil, Cavalli e cols. (2001), em estudo preliminar, encontraram a freqüência de 13,6% do alelo CYP3A4*1B em indivíduos brancos.

Recentemente, outras duas alterações genéticas foram observadas no gene da CYP3A4, designadas por alelos CYP3A4*2 (Ser222Pro) e CYP3A4*3 (Met445Thr) (Sata *et al.*, 2000). O alelo CYP3A4*2 resulta da troca de serina por prolina, no exon 7, posição 222 da proteína. Enquanto que o alelo CYP3A4*3 resulta da troca de metionina por treonina no exon 12, na posição 445 da seqüência peptídica, localizada na região de ligação ao grupo heme da proteína (Sata *et al.*, 2000).

O alelo CYP3A4*2 foi observado em 2,7% dos indivíduos brancos finlandeses, porém não foi encontrado em negros e Chineses (Sata *et al.*, 2000). Já o alelo CYP3A4*3 foi encontrado em apenas um de 51 chineses (Sata *et al.*, 2000). Nesse estudo, a presença do alelo CYP3A4*2 foi associada à redução de 6 a 9 vezes na depuração da nifedipina quando comparada ao alelo normal (CYP3A4*1), porém este fenômeno não foi

observado quando se comparou a atividade de hidroxilação da testosterona (Sata *et al.*, 2000).

Outras três mutações no gene da CYP3A4 descritas por Hsieh e cols. (2001), estão localizadas nos éxons 5, 7 e 9 do gene da CYP3A4. No éxon 5, foi observada a substituição A¹³⁹⁸⁹→G (Ile118Val, alelo CYP3A4*4) em 3 de 102 indivíduos chineses. A substituição C¹⁵⁸²⁰→G (Pro218Arg, alelo CYP3A4*5) foi encontrada no éxon 7 em 2 desses indivíduos. No éxon 9, foi identificada a inserção de uma adenina na posição 17776 da seqüência nucleotídica (alelo CYP3A4*6) que resulta no deslocamento da fase de leitura do gene (*frameshift*) e conseqüente criação de um códon de parada prematura na posição 285 da seqüência polipeptídica. Essa mutação foi observada em 9 dos 102 indivíduos estudados. A atividade enzimática da CYP3A4 nos indivíduos portadores desses três alelos variantes foi medida pela relação entre 6β-hidrocortisol e cortisol urinários. Todas as três mutações mostraram atividade diminuída da CYP3A4 quando comparadas às de indivíduos portadores do alelo CYP3A4*1 (Hsieh *et al.*, 2001).

Eiselt e cols. (2001) identificaram 10 mutações na região codificante do gene CYP3A4, sendo duas silenciosas e oito resultam em alterações de aminoácidos. A mais freqüente delas, G56D (CYP3A4*7) foi encontrada em 2,82% dos indivíduos caucasianos estudados. As outras mutações – R130Q (CYP3A4*8), V170I (CYP3A4*9), D174H (CYP3A4*10), T636M (CYP3A4*11), L373F (CYP3A4*12) e P416L (CYP3A4*13) – localizadas nos éxons 5, 6 e 11, foram encontradas em freqüências que variaram entre 0,24 e 2% em caucasianos. As proteínas resultantes das variantes alélicas G56D, V170I e a D174H, além da variante M445T (CYP3A4*3), também encontrada nesse estudo, tiveram expressão similar ao do alelo comum (CYP3A4*1A) em células de *E. coli* TOPP3 (Sata *et al.*, 2000; Eiselt *et al.*, 2001). T363M e L373F foram expressas em menores quantidades que quando comparadas à proteína selvagem enquanto R130Q e P416L não foram detectáveis em experimentos que verificaram a expressão dessas proteínas em bactérias portadoras dos vetores mutados .

Em experimentos com os substratos testosterona, progesterona e 7-benziloxi-4-(trifluorometil)coumarin (7-BFC), para averiguar a atividade catalítica "in vitro" de cada mutante, Eiselt e cols. (2001) observaram que a variante L373F manifestou aumento de 11 a 16 vezes na hidroxilação da testosterona, porém não mostrou diferença na metabolização da progesterona e do 7-BFC.

Lamba e cols. (2002), descreveram as mutações L15P (CYP3A4*14), R162Q (CYP3A4*15) e T185S (CYP3A4*16), localizadas nos éxons 1, 6 e 7, respectivamente. Nenhuma dessas variantes foi associada com diminuição da expressão hepática da CYP3A4, nem com menor atividade da mesma enzima, em testes "in vivo" em asiáticos, japoneses e mexicanos.

Em síntese, três variantes alélicas – CYP3A4*2, CYP3A4*12 e CYP3A4*18 – foram associadas até o momento a maior atividade catalítica em relação a alguns substratos, como nifedipina e testosterona, quando comparadas ao tipo selvagem, enquanto a CYP3A4*17 (exon 7) apresentou redução na hidroxilação da testosterona (Sata *et al.*, 2000; Eiselt *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2001).

Esses recentes estudos demonstram que a variabilidade na resposta terapêutica pode estar fortemente associadas às alterações genéticas nas enzimas metabolizadoras de fármacos e que o tipo e freqüência dessas mutações são também altamente variáveis em populações de diferentes origens. Considerando que a freqüência de mutações no gene da CYP3A4 são desconhecidas em indivíduos brasileiros e a relevância de estudos farmacogenéticos para o tratamento individualizado de portadores de hipercolesterolemia, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo a freqüência de efeitos adversos, nosso estudo pretende detectar e identificar as alterações genéticas do gene da CYP3A4 e associá-las à variabilidade na resposta terapêutica em indivíduos brasileiros tratados com atorvastatina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Estudar a influência de mutações e polimorfismos do gene da enzima CYP3A4 na resposta terapêutica à atorvastatina de indivíduos brasileiros hipercolesterolêmicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Detectar mutações e polimorfismos no gene da enzima CYP3A4 em indivíduos com hipercolesterolemia.
- Avaliar a frequência das variações genéticas da CYP3A4 em indivíduos brasileiros.
- Estudar a influência das alterações genéticas da enzima CYP3A4 na resposta terapêutica à atorvastatina de indivíduos brasileiros hipercolesterolêmicos.

3. CASUÍSTICA E PROTOCOLO TERAPÊUTICO

3.1. Casuística

Foram estudados 120 indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 84 anos, sendo que destes, 95 são brancos e 25 são negros. Dentre esses indivíduos, 32 (24 mulheres e 8 homens) apresentam diagnóstico clínico e laboratorial de hipercolesterolemia familiar (HF) heterozigótica e 88 indivíduos apresentam hipercolesterolemia primária (HP) poligênica, seguindo-se os critérios das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (2001) e da Organização Mundial da Saúde (Organização Mundial da Saúde, 1998; Williams *et al.*, 1993). Os pacientes foram acompanhados por cardiologistas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (FM-USP) e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

Foram também estudados 90 indivíduos brancos, de ambos os sexos, sem histórico familiar de hipercolesterolemia ou de doenças cardiovasculares, provenientes da Divisão de Higiene e Segurança Médica do Trabalho (DHSMT) da Universidade de São Paulo, SP. Esses indivíduos foram considerados como normolipidêmicos, de acordo com os critérios das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (2001).

Os indivíduos que apresentavam diabetes, hipotireodismo (com TSH superior a 7,5 $\mu\text{m/L}$), doenças hepáticas e/ou renais, e indivíduos em tratamento com hipolipemiantes ou com contraceptivo oral, não foram incluídos no estudo.

Na casuística, foram incluídos indivíduos de cor negra para os estudos de avaliação da resposta a atorvastatina e para os estudos de pesquisa de mutações no gene CYP3A4. Para os estudos de frequências gênicas do polimorfismo 5'PR, os indivíduos de cor negra foram analisados separadamente, devido às diferenças interétnicas das frequências gênicas.

As características clínicas e biodemográficas dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF) e primária (HP) e do grupo controle estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características biodemográficas dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF) e hipercolesterolemia primária (HP) e controles.

	HF (32)	HP (88)	GC (90)
Sexo			
Feminino	75% (24)	68% (60)	53% (48)
Masculino	25% (8)	32% (28)	47% (42)
Cor			
Branca	100% (32)	72% (63)	100% (90)
Negra	-	28% (25)	-
Idade (anos)			
Média ± DP	54 ± 17	62 ± 9	44 ± 11
Faixa	18 – 84	32-82	30 – 78
Fatores de risco			
Hipertensão ^a	19% (6)	73% (64)	0%
Tabagismo	13% (4)	10% (9)	0%
Homens com idade ≥ 45 anos	50% (4/8)	89% (25/28)	38% (16/42)
Mulheres com idade ≥ 55 anos	71% (17/24)	82% (49/60)	10% (5/48)
Presença de xantomas	56% (18)	0% (0)	0%
Histórico Familiar de DAC ^b	84% (27)	65% (57)	0%

^aPA ≥ 140/90 mmHg; ^bparentes de primeiro grau com menos de 55 anos para homens e menos de 65 anos para mulheres; número de indivíduos entre parênteses.

3.2. Protocolo terapêutico

Os indivíduos estudados foram submetidos à dieta apropriada (equivalente a fase 1 da AHA – *American Heart Association*) (Moore *et al.*, 1990; Bae *et al.*, 1991) durante 4 semanas, seguida de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina, por via oral, durante as 4 semanas seguintes. Os pacientes portadores de HP tratados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, foram tratados com atorvastatina (20 mg/dia) por mais 4 semanas.

Os protocolos de tratamento foram previamente submetidos e aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) de cada Instituição envolvida no estudo e todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4).

A segurança clínica do tratamento com atorvastatina foi monitorada pelas determinações laboratoriais das enzimas alanina amino transferase (ALT) e creatina quinase (CK).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue de todos os indivíduos, após jejum de 12 horas, por meio de um sistema de coleta a vácuo, em tubos com EDTA (1 mg/mL sangue) e sem anticoagulante. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos em centrífuga Celm modelo LS 35 (Celm, SP, Brasil) para obtenção do soro a ser usado nas determinações bioquímicas. As amostras de sangue total, coletadas com EDTA, foram utilizadas para a extração de DNA das células sangüíneas, a serem utilizados nas análises moleculares.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinações bioquímicas

As concentrações séricas de colesterol total (CT) e HDL-colesterol (HDL-C) foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico CHOD-POD (Allain *et al.*, 1974). O HDL-C foi determinado após a precipitação dos quilomícrons, VLDL e LDL com a adição de ácido fosfotúngstico e íons de magnésio (Burstein *et al.*, 1970).

Os triglicerídeos (TG) foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico GPO-POD (Ekindjian & Duchassaing, 1979). A concentração de VLDL-C foi obtida dividindo-se o resultado de TG por cinco (Friedewald *et al.*, 1972). A concentração de LDL-C foi obtida pela fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972), para concentrações de TG inferiores a 400 mg/dL.

As determinações de CT, TG, HDL-C, CK e ALT foram realizadas no analisador automático Roche/Hitachi 912 (Tóquio, Japão), com reagentes da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha).

4.2.2. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina otimizado em nosso laboratório (Salazar *et al.*, 1998). Centrifugou-se, em microtubo de 1,6 mL, 1 mL de sangue total a 1.800 x *g* por 5 min, à temperatura ambiente, utilizando microcentrífuga Celm modelo MC-CV (Celm, SP, Brasil), desprezando-se o sobrenadante. Adicionou-se ao sedimento 0,9 mL de tampão TM1 [Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0, EDTA a 2 mM (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), KCl a 10 mM (Merck S.A., RJ, Brasil), cloreto de magnésio a 10 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.) e Triton X-100 a 25 g/L (Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA, E.U.A.)]. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se por 5 min a 1.800 x *g*. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se por mais três vezes a lavagem do sedimento com o tampão TM1 sem a adição de Triton X-100.

Ao sedimento foram adicionados 0,2 mL de tampão TM2 [Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0, KCl a 10 mM, cloreto de magnésio a 10 mM, EDTA a 2 mM, NaCl a 0,4 mM (Merck S.A., RJ, Brasil)] e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.) a 10 g/L, em banho de água a 56°C, por 15 min. Adicionou-se 60 µL de NaCl a 5 M (Merck S.A., RJ, Brasil), agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 10.700 x *g*, por 5 min, em centrífuga Celm modelo MC-CV (Barueri, SP, Brasil), para a precipitação das proteínas. O sobrenadante foi transferido para um microtubo, ao qual se adicionou 1 mL de etanol absoluto (Merck S.A., RJ, Brasil) e manteve-se por 30 min a -20°C, para a precipitação do DNA. Centrifugou-se por 5 min a 10.700 x *g*, à temperatura ambiente e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol a 70%. Após a evaporação completa do etanol residual, o DNA extraído foi ressuspenso com 100 µL de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C.

4.2.3. Avaliação eletroforética do DNA genômico

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) (Sambrook & Russell, 2001). As amostras contendo 5 µL de DNA e 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas no gel submerso no tampão TBE. A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 45 min, empregando uma fonte modelo EPS 200 (Pharmacia Bioscience, Uppsala, Suécia), utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb, diluído no tampão de amostra em 1:6. Após a eletroforese, a visualização das bandas foi feita pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/L), sob luz ultravioleta em transiluminador modelo Macrovue (Pharmacia Bioscience, Uppsala, Suécia). A imagem do gel foi digitalizada com o auxílio do sistema de fotodocumentação composto pelo programa Chemilmager 4400 v 5.5 e o sistema de digitalização de imagens Multimage Light Cabinet da AlphaInnotech (San Leandro, CA, E.U.A.).

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A260/280) dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Fullerton, CA, E.U.A.) após a diluição das amostras (1:50) em tampão TE (Sambrook & Russell, 2001).

4.2.4. Avaliação do polimorfismo da região promotora do gene CYP3A4

4.2.4.1. Amplificação da região promotora 5' do gene CYP3A4

O polimorfismo localizado no nucleotídeo -392 da região promotora 5' (5'PR) do gene da CYP3A4 foi analisado pelo método de PCR-RFLP desenvolvido em nosso laboratório (Cavalli *et al*, 2001). Os iniciadores "sense" e "anti-sense" foram desenhados com base na seqüência disponível no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> acesso D11131). Esses

iniciadores permitem introduzir uma mutação no produto de PCR que gera um sítio de clivagem para a enzima *MboII*, nos indivíduos que apresentam o alelo mais freqüente (M+) (CYP3A4*1A) (Figura 4). Assim sendo, os produtos de PCR dos indivíduos portadores do alelo raro CYP3A4*1B não tem sítio de clivagem para a *MboII*.

O produto de PCR tem 385 bp e também apresenta um sítio de clivagem constitutivo para a *MboII*, que é útil como controle interno da reação de restrição enzimática. O fragmento gerado pela clivagem desse sítio constitutivo é de 175 bp e deve estar presente em toda reação de restrição com *MboII*, indicando a eficiência da atividade da enzima de restrição. Os fragmentos de 175, 169 e 41 bp, que indicam a presença de ambos os sítios de restrição para *MboII*, o constitutivo e o polimórfico, caracterizam o genótipo homozigoto para o alelo selvagem. Os indivíduos homozigotos para o alelo CYP3A4*1B, para os quais observam-se os fragmentos de 210 e 175 bp, não apresentam sítio de clivagem na região polimórfica. Já nos heterozigotos, pôde-se observar a presença dos quatro fragmentos: 210, 175, 169 e 41 bp, sendo estes caracterizados pelo genótipo heterozigotos.

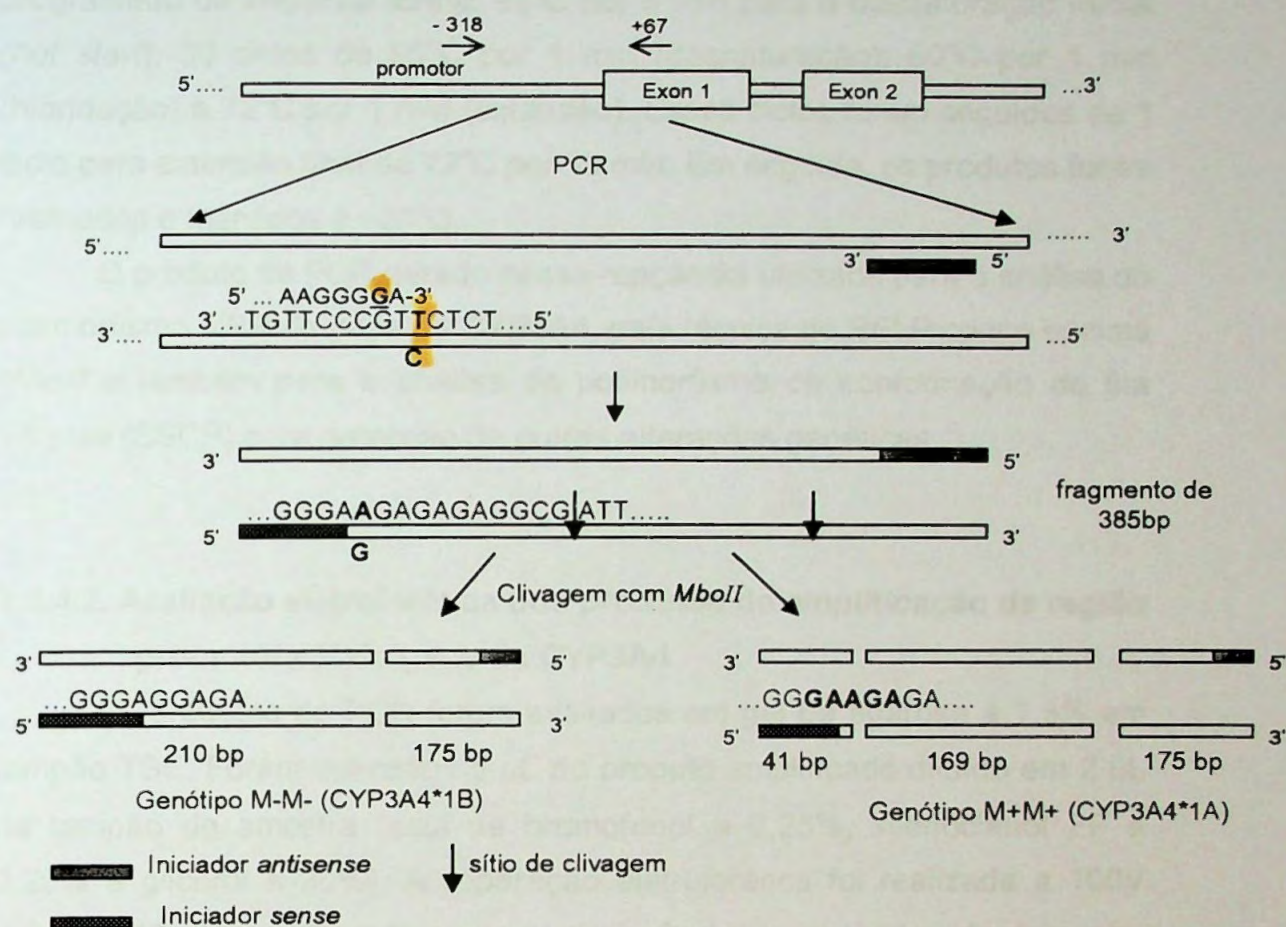


Figura 4: Representação esquemática da introdução de um sítio de clivagem da enzima *MboI* para análise do polimorfismo da região promotora 5' do gene da CYP3A4. Cavalli *et al.*, 2001.

A amplificação do fragmento da 5'PR do gene da CYP3A4 foi realizada em microtubo de 0,2 mL de volume, utilizando-se 10 pmol de cada iniciador (Life Technologies do Brasil, S.P., Brasil), tampão de PCR (KCl a 50 mM, MgCl₂ a 3,5 mM e Tris-HCl a 10 mM, pH 9,0), 200 μM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), aproximadamente 200 ng de DNA genômico e água esterilizada para volume final de 50 μL.

Homogeneizou-se o conteúdo dos tubos, os quais foram colocados no termociclador PTC-200™ (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.),

programado da seguinte forma: 98°C por 5 min para a desnaturação inicial (*hot start*); 30 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturação); 60°C por 1 min (hibridação) e 72°C por 1 min (extensão). Esses ciclos foram seguidos de 1 ciclo para extensão final de 72°C por 10 min. Em seguida, os produtos foram resfriados e mantidos à -20°C.

O produto de PCR gerado nessa reação foi utilizado para a análise do polimorfismo 5'PR do gene da CYP3A4, pela técnica de RFLP com a enzima *MboII* e também para a análise do polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) para detecção de outras alterações genéticas.

4.2.4.2. Avaliação eletroforética dos produtos de amplificação da região promotora 5' do gene da CYP3A4

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE. Foram aplicados 5 µL do produto amplificado diluído em 2 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%). A separação eletroforética foi realizada a 100V durante 40 min, utilizando-se como referência o marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp, diluído no tampão de amostra em 1:6. Em seguida, o gel foi corado em solução aquosa de brometo de etídeo a 0,5 mg/L. As bandas foram visibilizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta e a fotodocumentação do gel foi realizada em sistema já descrito anteriormente.

4.2.4.3. Restrição enzimática dos produtos de PCR

Os produtos de PCR (8,5 µL) foram digeridos com 5U de enzima de restrição *MboII* (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia) em microtubo de 0,5 mL, em tampão de reação 1 X (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 7 mM, KCl a 10 mM, 2-mercaptoetanol a 7 mM, BSA a 0,01%) para volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C, e os produtos de restrição foram posteriormente analisados.

4.2.4.4. Análise do Polimorfismo *MboII* do gene da CYP3A4

Os fragmentos de digestão dos produtos de restrição com a *MboII* foram identificados em gel de agarose a 3,0% corado com brometo de etídeo. A migração dos produtos de digestão com a *MboII* foi comparada com a do marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp, o qual foi utilizado diluído no tampão de amostra em 1:6. Após a separação eletroforética, realizada a 100V por 1 hora, três fragmentos de diferentes tamanhos puderam ser visibilizados, como ilustrado na **figura 5**.

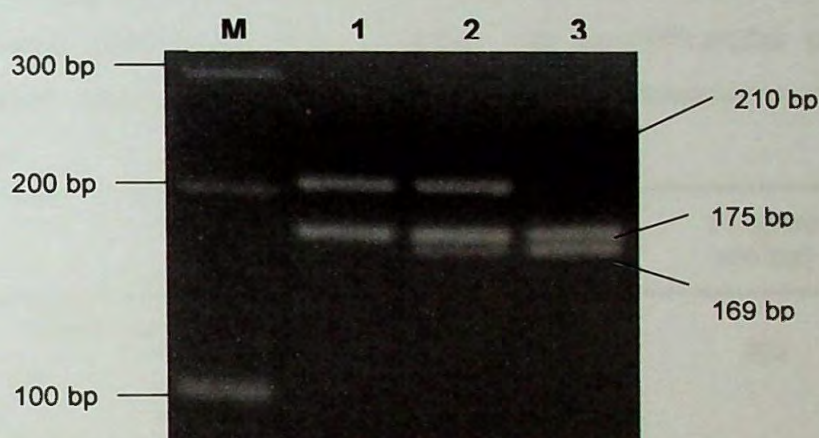


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição enzimática com *MboII* da região promotora 5' do gene da CYP3A4. Linha 1, genótipo homocigoto para o alelo CYP3A4*1B (210 e 175 bp); linha 2, genótipo heterocigoto (210, 175 e 169 bp); linha 3, genótipo homocigoto para o alelo selvagem (175 e 169 bp); linha M, marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

4.2.5. Triagem de alterações moleculares no gene da CYP3A4

4.2.5.1. Amplificação por PCR dos 13 exons do gene da CYP3A4

Para a amplificação pela técnica de PCR dos diferentes exons do gene da CYP3A4, foram desenhados iniciadores com base em seqüências publicadas e disponíveis na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> acesso AF280107. A seqüência de cada iniciador foi criada de modo a

flanquear cada um dos exons (Tabela 2), tomando cuidado de excluir as regiões que apresentam similaridade com os genes das enzimas CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43, que são isoenzimas da CYP3A4. É importante ressaltar que para cada exon foi criado um par de iniciadores específicos, com exceção do exon 13, que, pelo seu grande tamanho (> 500 bp), foi dividido em dois fragmentos (denominados de 13A e 13B) para que a análise do polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) fosse mais eficiente.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos, posições inicial e final dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação por PCR dos diferentes exons do gene da CYP3A4 e tamanhos dos produtos gerados.

Exon	Sequência	Fragmento (bp)	Posição no cDNA
Região Promotora	Forward 5' ggA Atg Agg ACA gCC ATA gAg ACA Agg ggA 3' Reverse 5' CCT TTC AgC TCT gTg TTg CTC TTT gCT g 3'	385	61615/61999
1	Forward 5' TgA TTC TTT gCC AAC TTC CA 3' Reverse 5' AAC AgA gAA gAg gAg CCT gg 3'	341	61799/62139
2	Forward 5' TAA AgT CAC AAT CgC TgT 3' Reverse 5' CAT AAg AAg CAA AAg AgT g 3'	174	65990/66163
3	Forward 5' Agg CAg ggT TAA gTA CAT TA 3' Reverse 5' CAA gTC TAT CCA ATg gAA gT 3'	146	67981/68126
4	Forward 5' ggT Tgg gCT CCA gCT gTA gA 3' Reverse 5' CAg TAT TTT AAT TTC AAC ACA TgA 3'	195	73357/73551
5	Forward 5' CAC TAA ATA gTT gTT gAA TAA g 3' Reverse 5' TAA gTT TCT TAT TAA AAC TCA T 3'	253	75770/76022
6	Forward 5' CCA TgT CCT TCT ggg ACT Ag 3' Reverse 5' ggC TgC gCT TCT ACT TAC TC 3'	171	76189/76359
7	Forward 5' gCT gAT TTT AAT TTT CCA CAT CTT TCT CC 3' Reverse 5' CTg TAT ATT TTA AgT ggA TgA ATT ACA Tgg Tg 3'	286 ^a	77572/77857
8	Forward 5' TTg TTT TgT TTT TCC TAC AgC 3' Reverse 5' CCT CCT ATA ACT ACC ACC ACA 3'	175	78831/79005

9	Forward 5' ggA gCC ACT TTC TgT CAg 3' Reverse 5' gCC CTC AgA AAC ACT CTg 3'	132	79624/79755
10	Forward 5' TgA TTT ACC TAA AAT gTC TTT C 3' Reverse 5' CTC CTT CTC CAT gTA CCA 3'	222	82060/82281
11	Forward 5' TCC AAA TCT gTT TCg TTC TTT C 3' Reverse 5' CTT CCC Agg ggC CTT g 3'	271	83817/84087
12	Forward 5' TTT AAA AAT CTA CCA ACg 3' Reverse 5' TTA TTT TTA TAg AAA ATT gAC TA 3'	215	85101/85315
13 ^a	Forward 5' TTT AAT gCT TCT CAA TAT gCT T 3' Reverse 5' Tgg Tgg AAA TAg TCC Cg 3'	396	87844/88239
13 ^b	Forward 5' CCA AAT CAg TgT gAg gAg 3' Reverse 5' TAT TTA CTT gTT ggT TCT CAT 3'	321	88180/88500

a: Hsieh *et al.* (2001)

b: de acordo com <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> (acesso AF280107)

As regiões que contém os exons da CYP3A4 foram amplificadas por PCR em microtubos de 0,2 mL de volume. O DNA genômico foi aquecido a 56°C durante 20 min e, aproximadamente 50 ng do mesmo foram amplificados nas seguintes condições de reação: tampão de PCR-1X (KCl a 50 mM, MgCl₂ a 2,0 mM e Tris-HCl a 10 mM, pH 9,0), 10 picomols de cada iniciador (Life Technologies do Brasil, S.P., Brasil), 200 µM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia) e água esterilizada para volume final de 50 µL.

Os tubos com os reagentes de PCR foram homogeneizados e colocados no termociclador modelo PTC 200 da M&J Research (Watertown, MA, E.U.A.) com capacidade para 96 amostras, tendo a seguinte programação geral: (1) desnaturação inicial (*hot start*): 98°C por 5 min; (2) amplificação: 30-35 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturação), 44 – 65°C por 1 min – 1 min e 45 s (hibridação) e 72°C por 1 min e 30 s (extensão); (3) extensão final: 72°C por 10 min. Ao final dos ciclos a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

Na **tabela 3**, observam-se condições otimizadas para a amplificação dos diferentes exons do gene da CYP3A4. As condições ideais de amplificação foram determinadas após os testes de concentração de MgCl₂, temperaturas e tempos de hibridação de acordo com as seqüências de iniciadores criadas e número de ciclos da reação.

Tabela 3: Condições otimizadas de temperatura e tempo de hibridação, concentração de MgCl₂ e número de ciclos das reações de PCR para a amplificação dos 13 exons do gene da CYP3A4.

Região	Temperatura/Tempo de Hibridação	Concentração final de MgCl ₂ (mM)	Número de ciclos
Exon 1	60°C/1min	4.0	30
Exon 2	60°C/1min e 30s	4.0	35
Exon 3	55°C/1min	4.0	30
Exon 4	51°C/1min	4.0	30
Exon 5	55°C/1min	4.0	30
Exon 6	55°C/1min	4.0	35
Exon 7	60°C/1min	4.0	30
Exon 8	55°C/1min	4.0	30
Exon 9	60°C/1min	4.0	30
Exon 10	51°C/1min	2.0	35
Exon 11	55°C/1min	4.0	30
Exon 12	51°C/1min e 45 s	4.0	35
Exon 13A	51°C/1min	4.0	30
Exon 13B	44°C/1min	4.0	35

O tamanho dos fragmentos amplificados variou entre 132bp para o exon 9 e 396bp para um dos fragmentos do exon 13 (denominado 13A), do gene da CYP3A4.

4.2.5.2. Avaliação eletroforética dos produtos de amplificação dos exons do gene da CYP3A4

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE. Foram aplicados 5 μ L do produto de PCR, diluídos em 2 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%). O marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp diluído também no tampão de amostra em 1:6. A separação eletroforética foi realizada a 100 V durante 45 minutos. A seguir, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg/L) e as bandas de DNA foram visibilizadas sob luz UV e a imagem do gel foi digitalizada com o auxílio do sistema de fotodocumentação já descrito. Os produtos de PCR foram armazenados a -20°C até a análise por SSCP. Na **figura 6**, são mostrados os produtos amplificados dos diversos exons e da região promotora do gene da CYP3A4.

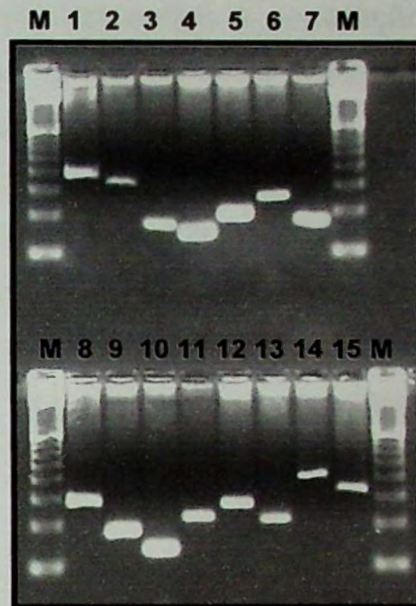


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos PCR dos 13 exons e da região promotora do gene da CYP3A4. Linha 1: região promotora (385 bp); linha 2: exon 1 (341 bp); linha 3: exon 2 (174 bp); linha 4: exon 3 (146 bp); linha 5: exon 4 (195 bp); linha 6: exon 5 (253 bp); linha 7: exon 6 (171 bp); linha 8: exon 7 (286 bp); linha 9: exon 8 (175 bp); linha 10: exon 9 (132 bp); linha 11: exon 10 (222 bp); linha 12: exon 11 (271 bp); linha 13: exon 12 (215 bp); linha 14: exon 13A (396 bp); linha 15: exon 13B (321 bp); M, marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

4.2.6. Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP)

A triagem de alterações moleculares nos 13 exons e da porção próxima ao início do exon 1 da região promotora 5' do gene da CYP3A4 foi realizada pela técnica de SSCP, empregando o sistema semi-automático de eletroforese GenePhor™ da Amersham Bioscience (Uppsala, Suécia).

Resumidamente, 1 μ L de produto de amplificação foi diluído em 20 μ L de solução desnaturante (formamida a 95%, EDTA a 10 mM, xilenocianol a 0,05% e azul de bromofenol a 0,05%), e submetido à desnaturação por 8 min a 95°C. Imediatamente transferido para um banho de gelo. A seguir, 5

μ L dessa mistura foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 12,5%, utilizando o *kit* comercial GeneGel Excel 12.5/24 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia) que inclui os tampões de eletroforese e os géis de poliacrilamida. A seguir, os géis foram corados com nitrato de prata (Salazar *et al.*, 2002).

As condições eletroforéticas para avaliação do SSCP dos 13 exons e da região promotora do gene da CYP3A4 foram otimizadas pelo uso das amostras previamente seqüenciadas, como descrito anteriormente, e pelo uso de 3 amostras-controle positivas para mutações nos exons 5, 7 e 9 do gene estudado.

Todas as regiões estudadas foram do gene da CYP3A4, foram avaliadas em diferentes condições eletroforéticas, que incluíram 4 temperaturas diferentes (5, 8, 12 e 15°C), tempos (1 a 3 horas) e voltagens (400 a 600 volts) diferentes.

De modo geral, os perfis de SSCP às temperaturas de 5 e 8°C se assemelham, enquanto que à 12 e 15°C os perfis mantêm similaridade entre si. Às temperaturas baixas (5 e 8°C), os perfis dos exons 1, 5, 6, 8, 10, 11 e 13A dos produtos amplificados de gene da CYP3A4 apresentaram melhor resolução, enquanto que para os exons 2, 3, 4, 7, 9, 12 e 13B, temperaturas acima de 12°C resultaram em perfis mais bem definidos. Assim, todos os fragmentos foram analisados em pelo menos duas temperaturas diferentes, para assegurar maior sensibilidade da técnica de SSCP (Salazar *et al.*, 2002).

As condições otimizadas após a padronização da eletroforese para o SSCP das diferentes regiões estudadas do gene da CYP3A4, estão contempladas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Condições de separação eletroforética para a detecção do SSCP dos diferentes exons do gene da CYP3A4.

Região	Concentração do Gel	Temperatura	Voltagem	Tempo
Promotora 5'	12,5%	12°C	400 V	2:30 h
Exon 1	12,5%	8°C	600 V	2:00 h
Exon 2	12,5%	15°C	600 V	1:20 h
Exon 3	12,5%	15°C	600 V	1:20 h
Exon 4	12,5%	12°C	600 V	1:20 h
Exon 5	12,5%	5°C	600 V	1:20 h
Exon 6	12,5%	5°C	600 V	1:20 h
Exon 7	12,5%	12°C	600 V	1:40 h
Exon 8	12,5%	5°C	600 V	1:20 h
Exon 9	12,5%	12°C	600 V	1:20 h
Exon 10	12,5%	5°C	600 V	1:20 h
Exon 11	12,5%	5°C	600 V	1:20 h
Exon 12	12,5%	12°C	600 V	1:20 h
Exon 13A	12,5%	8°C	600 V	2:00 h
Exon 13B	12,5%	15°C	600 V	2:00 h

Com a finalidade de validar as condições eletroforéticas que apresentaram melhor resolução de perfil de SSCP, foram testadas amostras de DNA contendo mutações conhecidas (amostras-controle mutadas), nos exons 5 (A→G, nucleotídeo 13989, alelo CYP3A4*4), 7 (C→G, nucleotídeo 15820, alelo CYP3A4*5) e 9 (insA, nucleotídeo 17776, alelo CYP3A4*6) do gene CYP3A4. Essas amostras-controle mutadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jin-ding Huang da National Cheng Kung University, China.

De acordo com Salazar e cols., (2002) a utilização de duas temperaturas diferentes na separação eletroforética para estabelecer os perfis de SSCP eleva a eficiência de detecção de mutações para até 97%. Assim, com o auxílio das amostras-controle mutadas, observou-se perfil alterado de SSCP para os exons 7 e 9 em todas as temperaturas testadas

(5, 8 e 15°C), correspondendo a eficiência de 100% (**Figura 7A, 7B e 7C, linhas 8 e 12**). Já para os produtos de amplificação do exon 5, as temperaturas de 5 e 8°C apresentaram diferença mais nítida nos perfis eletroforéticos do controle mutado quando comparado aos perfis das amostras-controle normais (**Figura 7A, 7B, linha 4**). Porém à 15°C, a diferença de perfil eletroforético entre a amostra-controle mutada e as amostras-controle normais foi muito tênue (**Figura 4C, linha 4**).

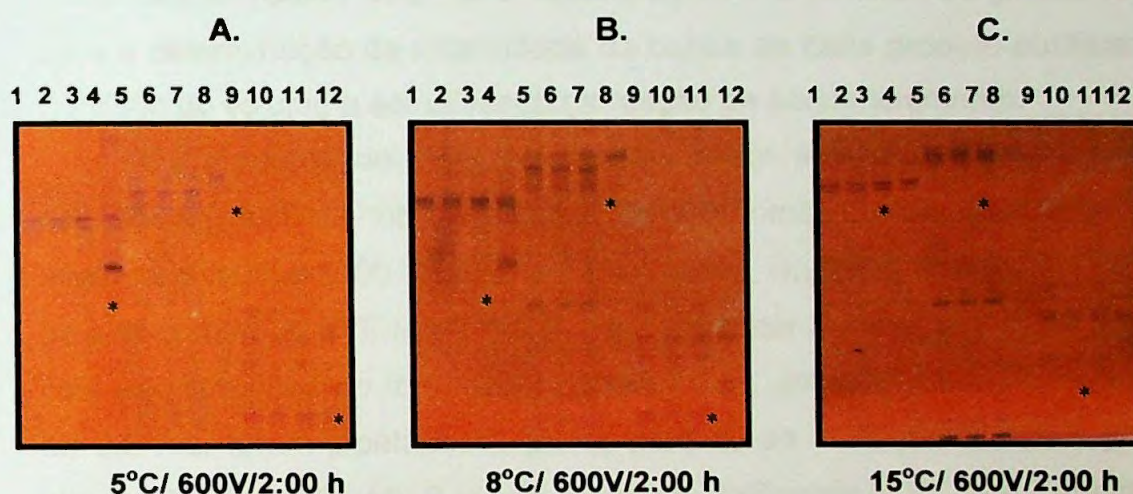


Figura 7. Perfis de SSCP dos produtos de amplificação de amostras normais (linhas 1-3, 5-7 e 9-11) e mutadas (linhas 4, 8 e 12) dos exons 5 (linhas 1-4), 7 (linhas 5-8) e 9 (linhas 9-12) em gel de poliacrilamida 12,5% corado com prata, em diferentes temperaturas. A. 5°C; B. 8°C; C. 15°C. (*) indicam amostras com perfil de SSCP alterado.

4.2.7. Sequenciamento semi-automatizado do DNA

Os produtos de PCR dos exons e da 5'PR do gene da CYP3A4 de três amostras de DNA selecionadas (amostras-controle) foram seqüenciados, para verificar se os genes das isoenzimas da CYP3A4 (CYP3A5, 3A7 e 3A43) não seriam amplificados nas condições de amplificação estabelecidas. Foram seqüenciadas também as amostras que apresentaram perfil eletroforético de SSCP alterado, quando comparados

aos perfis das amostras-controle e também com os perfis das amostras mutadas dos exons 5, 7 e 9.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *kit MicroSpin™ Columns* da Amersham Bioscience (Uppsala, Suécia), seguindo-se as instruções do fabricante. Em seguida, esses produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. Os sinais dos produtos de PCR foram comparados com o padrão *Low DNA Mass Ladder* (Gibco BRL® Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), para a determinação da intensidade da banda de cada produto purificado e previsão do volume a ser utilizado na reação de sequenciamento.

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à análise de seqüência de DNA no analisador semi-automático MegaBACE™ DNA Analysis Systems 1000 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia) utilizando-se o *kit comercial DYEnamic™ ET Dye Terminator Sequencing Kit* de acordo com as instruções do fornecedor. Brevemente, em tubo de microcentrifuga de 0,2 mL, foram pipetados 4 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de oligonucleotídeo (5 µM), 8 µL do reagente *DYEnamic™ ET Dye Terminator Sequencing Kit* (dideoxynucleotídeos marcados, deoxynucleotídeos, cloreto de magnésio e *Thermo Sequenase II* DNA polimerase), e água deionizada esterilizada suficiente para completar o volume final para 20 µL. Em seguida, a reação de sequenciamento foi realizada no termociclador PTC-200™ (MJ Research, Watertown, MA, EUA). Os tubos foram submetidos a 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Os produtos seqüenciados foram purificados por precipitação com acetato de amônia e etanol. Acrescentou-se 2 µL de acetato de amônia 7,5M e, aproximadamente, 55 µL de etanol absoluto a cada tudo. Os tubos foram mantidos em repouso por 15 min, protegidos da luz e, em seguida, centrifugados em centrífuga Centrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 15 min a 12.000 rpm, a temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi completamente aspirado e o sedimento lavado duas vezes com 150 µL de etanol a 70%, misturando-se em agitador de tubos a cada troca do etanol, e centrifugou-se por 15 min a 12.000 rpm a temperatura

ambiente. Após a completa evaporação do etanol, o precipitado foi ressuspenso em 10 µL de *Loading Solution* (formamida a 70%, 1mM EDTA) e mantido a 4°C.

Os produtos de sequenciamento purificados e preparados foram separados por eletroforese capilar, em uma matriz linear de poliacrilamida *Longread Matrix* (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). Foi realizada a pré-eletroforese a 2,0 kVA por 60 s e, posteriormente, fez-se a injeção das amostras e a eletroforese capilar foi realizada a 9,0 kVA por 100 min.

Para análise das seqüências, foi utilizado o programa Sequence Analyser Base Caller Cimarron, versão 3.12 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia), a partir dos eletrofluorogramas gerados. As seqüências obtidas foram comparadas com as publicadas empregando o programa BLAST2 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

4.2.8. Constituição de amostras-controle para a técnica de SSCP

Amostras de DNA de três indivíduos diferentes foram amplificadas para cada região estudada do gene da CYP3A4 e foram seqüenciadas para que nos certificássemos que apenas o gene da CYP3A4 estivesse sendo amplificado e não os genes de suas isoenzimas (**figura 8**). Com a identificação das seqüências nucleotídicas desses DNAs, que foram primeiramente comparadas com o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> acesso AF280107), foi possível a constituição de amostras-controle para o SSCP. Deste modo, os perfis eletroforéticos de SSCP que diferiram do dessas amostras-controle, serão investigados também pela técnica de sequenciamento de DNA, para a identificação das alterações moleculares específicas.

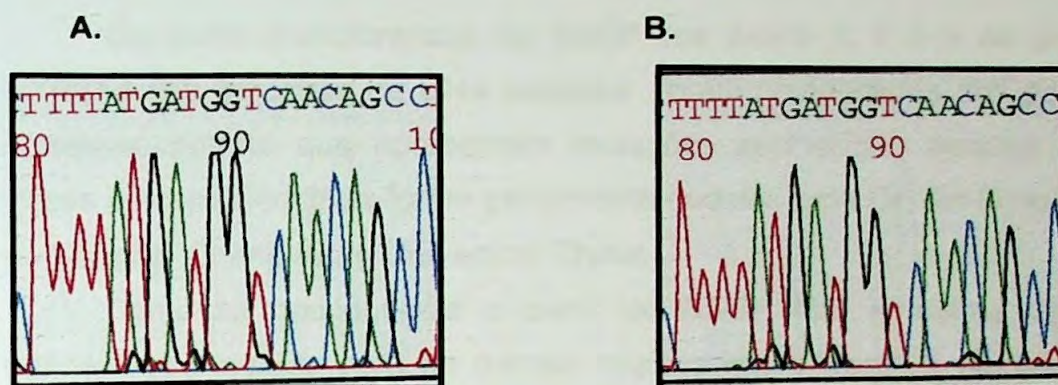


Figura 8. Eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento dos produtos amplificados do exon 4 do gene da CYP3A4, de duas amostras de DNA (A e B) selecionadas para constituição de amostras-controle para a técnica de SSCP.

4.2.9. Controle de Qualidade dos testes bioquímicos e moleculares

A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas de lipídeos foi realizada pela determinação concomitante de soros controle Normal e Patológico Precinorm® e Precipath® da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha) e pela participação no Programa de Controle de Qualidade (PELM) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).

Em todas as reações de PCR realizou-se controle de qualidade dos reagentes utilizados. O controle de reagentes constituiu-se de um tubo com todos os reagentes e sem amostras de DNA. Para avaliar a reprodutibilidade da reação de PCR, 10% das amostras foram repetidas (Neumaier *et al.*, 1998).

O controle de qualidade da digestão dos produtos de amplificação da 5'PR do gene da CYP3A4 com *MboII* foi realizado pela observação do fragmento de 175 bp em todas as reações de restrição enzimática. Esse fragmento corresponde ao produto de digestão gerado por ação da enzima *MboII* no sítio constitutivo do produto amplificado, que caracteriza o controle interno da reação.

Os perfis eletroforéticos de SSCP dos exons 5, 7 e 9 do gene da CYP3A4 das amostras de DNA testadas foram comparados aos perfis de amostras-controle que apresentam mutações conhecidas nesses exons. Essas amostras-controle foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jin-Ding Huang da National Cheng Kung University, China.

Como se desconhecia o perfil de SSCP das amostras de DNA normais ou mutadas para as demais regiões estudadas, foi necessário o desenvolvimento de controles que pudessem indicar alterações no perfil de SSCP. Para tal, 3 amostras foram selecionadas para a determinação da seqüência nucleotídica de todos os exons e 5'PR do gene da CYP3A4, utilizando a técnica de sequenciamento. As seqüências de DNA de cada exon do gene CYP3A4, obtidas por sequenciamento foram comparadas com as seqüências já publicadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> acesso AF280107). Essas amostras de DNA foram utilizadas como controles dos perfis eletroforéticos de SSCP.

4.2.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa SigmaStat para Windows, versão 2.0. Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas, a análise foi feita pela observação dos valores mínimos e máximos, cálculo de médias e desvios-padrão. Para as variáveis classificatórias calcularam-se as freqüências absolutas e relativas.

Para a análise da hipótese de igualdade de proporções entre os grupos utilizou-se o teste qui-quadrado (χ^2). A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada pelo teste *t* de Student e pela Análise de Variância (ANOVA) com múltiplos fatores. Para as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Bonferroni. Para valores com distribuição anormal as variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks e teste complementar de Dunn.

O nível de significância considerado para os testes foi de 5% ($p < 0,05$). A relação entre as frequências gênicas e genóticas (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) foi também avaliada pelo teste de qui-quadrado (Beiguelman, 1995).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros lipídicos dos grupos de estudo

Na tabela 5, estão apresentadas as concentrações séricas dos parâmetros lipídicos avaliados nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), hipercolesterolemia primária (HP) e controles (GC).

Como esperado, observa-se que os indivíduos do grupo formado por pacientes portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) apresentam concentrações séricas de CT e LDL-C maiores e de HDL-C menores que as observadas nos grupos HP e GC. Os indivíduos HP apresentam concentrações médias de CT, TG, LDL-C e VLDL-C, maiores que as encontradas no CG.

Tabela 5. Concentrações séricas de lípides (Média \pm DP) dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), hipercolesterolemia primária (HP) e controles (GC).

Lípides (mg/dL)	HF (n=32)	HP (n=88)	GC (n=90)	<i>P</i> ^a
Colesterol total	367 \pm 58	284 \pm 42	177 \pm 22	< 0,0001
Triglicérides	132 \pm 41	172 \pm 72	90 \pm 35	< 0,0001
HDL-C	43 \pm 15	53 \pm 15	50 \pm 12	0,0030
LDL-C	297 \pm 63	196 \pm 39	109 \pm 21	< 0,0001
VLDL-C	26 \pm 8	34 \pm 14	18 \pm 7	< 0,0001
	HF vs. GC ^b	HP vs. GC ^b	HF vs. HP ^b	
Colesterol total	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	
Triglicérides	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	
HDL-C	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> = 0,317	<i>P</i> < 0,05	
LDL-C	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	
VLDL-C	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	<i>P</i> < 0,05	

^a Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks; ^b comparações múltiplas: Método de Dunn; NS, não significativo. HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; n, número de indivíduos.

5.2. Avaliação da resposta terapêutica a atorvastatina nos indivíduos HF e HP

O efeito da atorvastatina sobre o perfil lipídico foi avaliado nos 32 indivíduos adultos, portadores de hipercolesterolemia familiar heterozigótica (HF) e nos 88 indivíduos com hipercolesterolemia primária poligênica (HP), após 4 semanas de tratamento diário com 10 mg do medicamento. A primeira variável de eficácia foi a porcentagem de variação, em relação ao valor basal, da concentração de LDL-C plasmático calculado. Foi considerado como resposta positiva redução superior a 15% na concentração de LDL-C (Stein *et al.*, 1997). Também foi determinada a alteração percentual em relação ao valor basal das variáveis dos demais lípidos e lipoproteínas séricas. Os parâmetros adicionais de eficácia incluíram colesterol total, triglicérides, HDL-C e VLDL-C.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a redução de LDL-C superior e inferior a 15%, sendo considerados respondedores e não-respondedores, respectivamente (Stein *et al.*, 1997).

Ao avaliar os dados dos pacientes com hipercolesterolemia familiar estudados, observou-se que 26 dos 32 pacientes apresentaram redução de LDL-C superior a 15%, com média de -37% (**Tabela 6**). A redução da concentração de colesterol total, triglicérides e VLDL-C foram: -31%, -20% e -21%, respectivamente. Foi observado também aumento de +11% nas concentrações de HDL-C (**Tabela 6**). Por outro lado, 6 indivíduos apresentaram redução de LDL-C inferior a 15% (média de -4%) e foram classificados como não-respondedores (**Tabela 7**).

Tabela 6. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média ± DP) dos pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF) heterozigótica que responderam ao tratamento com 10 mg de atorvastatina (n=26).

Lípides (mg/dL)	Basal	Após tratamento	Varição (%) ^a	P ^b
Colesterol total	368 ± 52	253 ± 48	-31 ^c	< 0,0001
Triglicerídeos	135 ± 44	103 ± 33	-20	0,0047
HDL-C	44 ± 15	48 ± 13	+11	NS ^d
LDL-C	297 ± 53	190 ± 53	-37	< 0,0001
VLDL-C	27 ± 9	21 ± 7	-21	0,0046

^a +/- indica aumento ou redução; ^b Teste *t* de Student pareado; ^cvariação média; ^dNS, não significativo; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL.

Tabela 7. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (média ± DP) dos pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF) heterozigótica que não responderam ao tratamento com 10 mg de atorvastatina (n=6).

Lípides (mg/dL)	Basal	Após tratamento	Varição (%) ^a	P ^b
Colesterol total	362 ± 88	348 ± 78	-4 ^c	NS ^d
Triglicerídeos	117 ± 17	101 ± 17	-11	NS
HDL-C	41 ± 15	42 ± 18	0	NS
LDL-C	298 ± 102	283 ± 95	-4	NS
VLDL-C	24 ± 4	21 ± 4	-8	NS

^a +/- indica aumento ou redução; ^b Teste *t* de Student pareado; ^cvariação média; ^dNS, não significativo; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL.

No grupo HP, os pacientes foram tratados com 10 mg/dia de atorvastatina por 4 semanas e depois com 20 mg/dia por mais 4 semanas. Assim, podemos observar, na **tabela 8**, as concentrações médias dos parâmetros lipídicos analisados para os pacientes que responderam aos tratamentos com 10 e 20 mg de atorvastatina.

Tabela 8. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média ± DP) dos pacientes com hipercolesterolemia primária (HP) poligênica que responderam ao tratamento com 10 mg e 20 mg de atorvastatina.

Lípides (mg/dL)	Após tratamento			P ^a
	Basal (n=85)	10mg (n=85)	20mg (n=80)	
Colesterol total	285 ± 42	199 ± 33	186 ± 36	< 0,0001
Triglicérides	171 ± 71	133 ± 52	120 ± 54	< 0,0001
HDL-C	53 ± 15	54 ± 15	56 ± 15	0,411
LDL-C	197 ± 39	118 ± 28	106 ± 30	< 0,0001
VLDL-C	34 ± 14	27 ± 11	24 ± 11	< 0,0001
	basal vs. 10mg ^b	basal vs. 20mg ^b	10 vs. 20 mg ^b	
Colesterol total	P < 0,05	P < 0,05	NS	
Triglicérides	P < 0,05	P < 0,05	NS	
HDL-C	NS	NS	NS	
LDL-C	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	
VLDL-C	P < 0,05	P < 0,05	NS	

^aANOVA; ^b comparações múltiplas: Método de Bonferroni; NS, não significativo. HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; n, número de indivíduos.

Observa-se que a média de variação de LDL-C sérica foi de -40% para os indivíduos tratados com 10 mg de atorvastatina, durante 4 semanas, enquanto que de colesterol total, triglicérides e VLDL-C foram: -30%, -18% e -18%, respectivamente, entre os indivíduos considerados respondedores. Entre os não respondedores tratados com o mesmo esquema terapêutico,

observou-se queda de 1,8% nas concentrações de CT, 23,7% em triglicérides e 23,4% na VLDL-C. Tanto HDL como LDL tiveram elevação de 5,9% e 5,5%, respectivamente. Nenhum dos lipídes nesses indivíduos teve variação significativa (**Figura 9**).

Entre os indivíduos portadores de HP que seguiram o tratamento com 20 mg de atorvastatina por mais 4 semanas, observou-se variação de -47% nas concentrações de LDL-C e de -36%, -24% e -24% nas concentrações de colesterol total, triglicérides e VLDL-C, respectivamente. Já entre os que não responderam adequadamente ao tratamento (dois indivíduos) observou-se reduções de 12,8%, 13,3%, 4%, 16,1% e 13,3 % nas copncetrações de CT, TG, HDL-C, LDL-C e VLDL (**Figura 10**).

Na **tabela 9** são apresentadas as concentrações médias e porcentagens de variação dos parâmetros de perfil lipídico para os indivíduos que não responderam ao tratamento com 10 e 20 mg de atorvastatina (**Figuras 9 e 10**). Apenas 3 indivíduos não responderam ao tratamento com 10 mg de atorvastatina (variação média de LDL-C = +6%). Desses três, 2 indivíduos foram tratados com 20mg de atorvastatina e também não tiveram resposta terapêutica adequada (variação média de LDL-C = -16%).

Tabela 9. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média \pm DP) dos pacientes com hipercolesterolemia primária (HP) poligênica que não responderam ao tratamento com 10 mg e 20 mg de atorvastatina.

Lípides (mg/dL)	Após tratamento			P ^a
	Basal (n=3)	10 mg (n=3)	20 mg (n=2)	
Colesterol total	258 \pm 12	253 \pm 22	224 \pm 28	0,253
Triglicérides	194 \pm 123	119 \pm 33	113 \pm 62	0,510
HDL-C	50 \pm 21	51 \pm 17	57 \pm 20	0,908
LDL-C	170 \pm 11	179 \pm 11	145 \pm 35	0,227
VLDL-C	39 \pm 24	24 \pm 7	23 \pm 12	0,511

^a.Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks. HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; n, número de indivíduos.

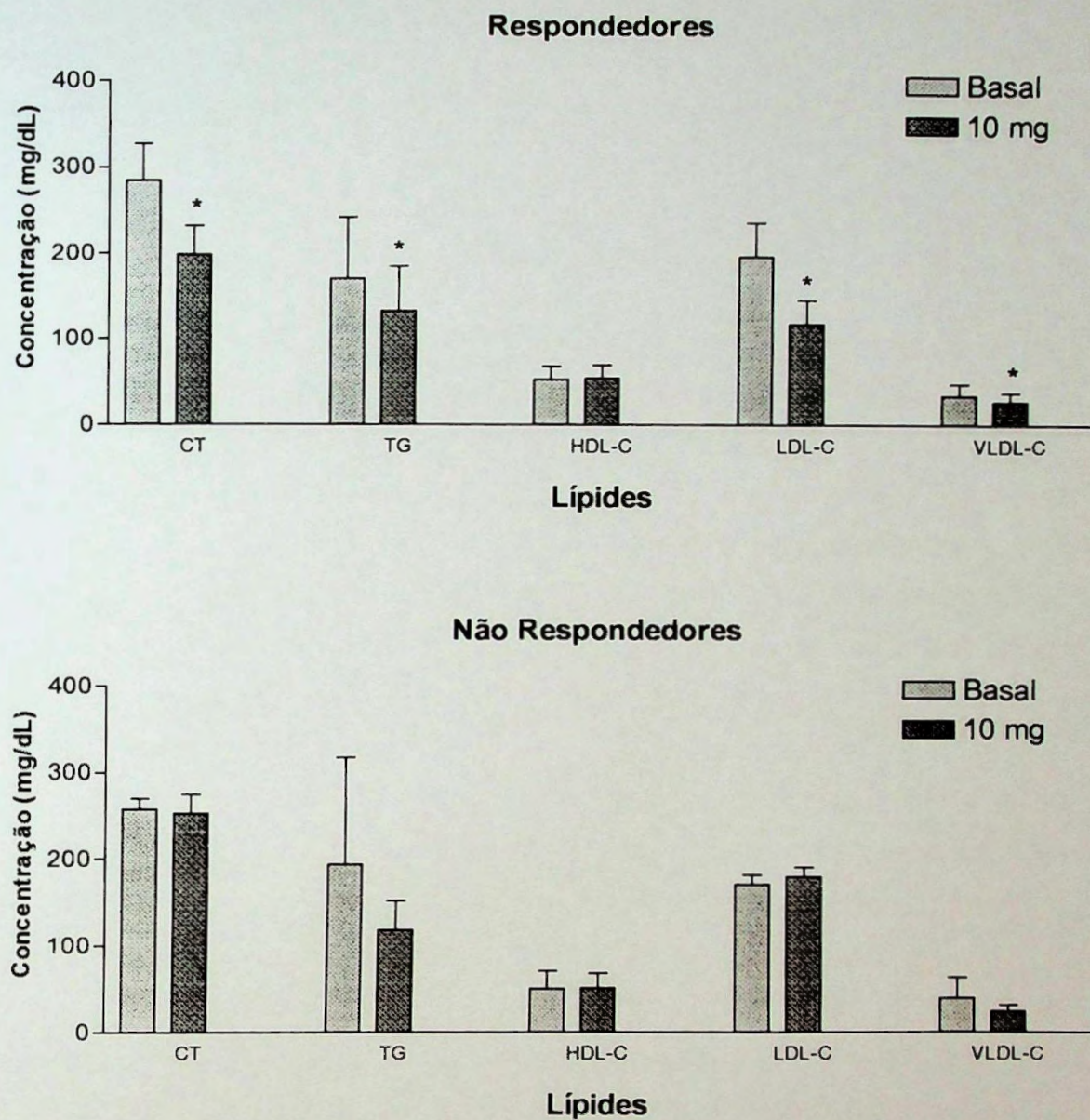


Figura 9. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média \pm DP), basais e após 4 semanas com tratamento de 10 mg de atorvastatina, dos pacientes com hipercolesterolemia primária, classificados de acordo com a resposta terapêutica (respondedor: LDL-C > 15% de redução, após tratamento). *P < 0,05 (teste t).

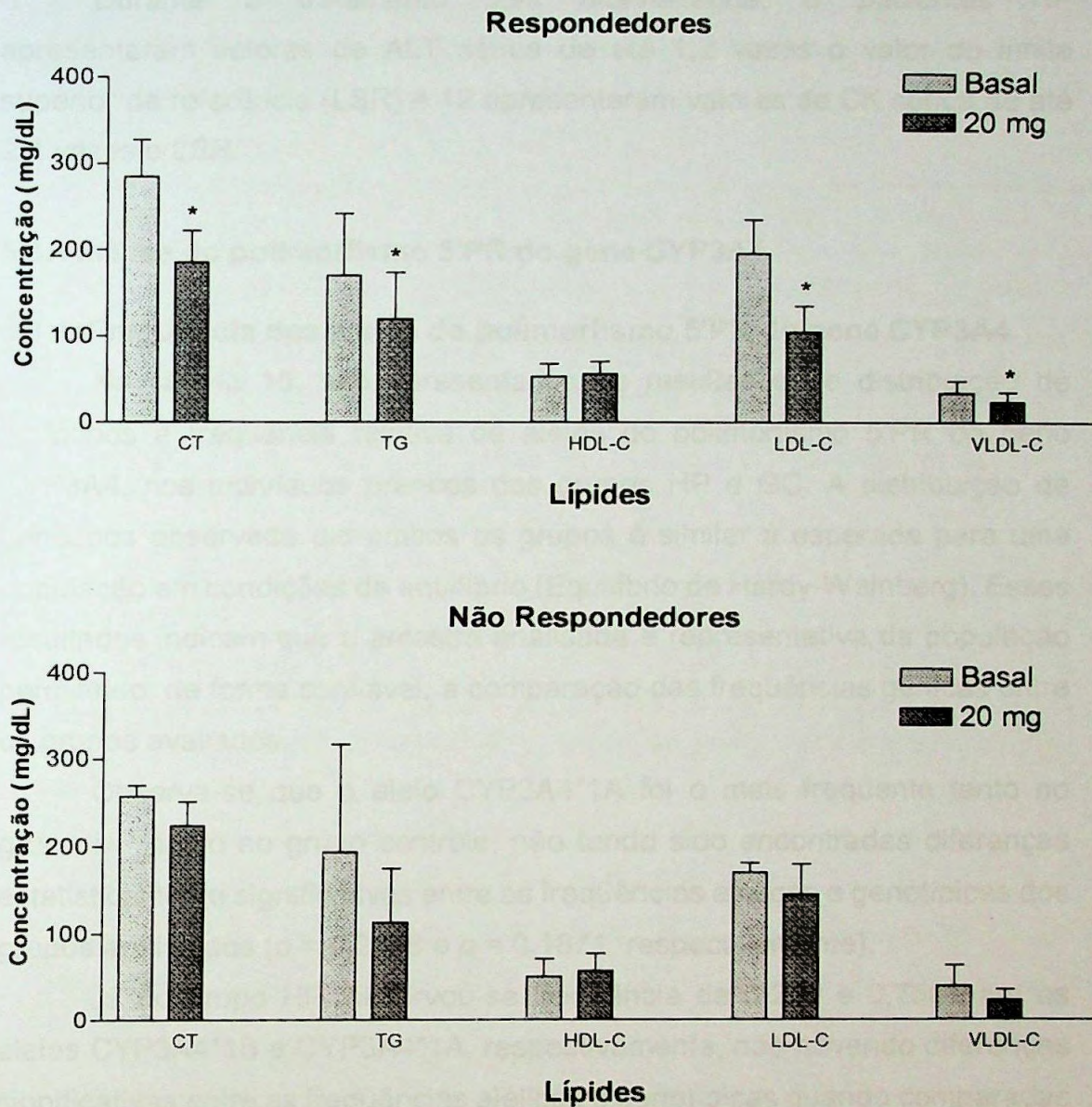


Figura 10. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média \pm DP), basais e após 4 semanas com 20 mg de atorvastatina, dos pacientes com hipercolesterolemia primária, classificados de acordo com a resposta terapêutica (respondedor: LDL-C > 15% de redução após tratamento). *P < 0,05 (teste t).

Durante o tratamento com atorvastatina, 3 pacientes HP apresentaram valores de ALT sérica de até 1,2 vezes o valor do limite superior de referência (LSR) e 12 apresentaram valores de CK sérica de até 2,4 vezes o LSR.

5.3. Análise do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4

5.3.1. Frequência dos alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4

Na **tabela 10**, são apresentados os resultados de distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4, nos indivíduos brancos dos grupos HP e GC. A distribuição de genótipos observada em ambos os grupos é similar à esperada para uma população em condições de equilíbrio (Equilíbrio de Hardy-Weinberg). Esses resultados indicam que a amostra analisada é representativa da população permitindo, de forma confiável, a comparação das frequências gênicas entre os grupos avaliados.

Observa-se que o alelo CYP3A4*1A foi o mais freqüente tanto no grupo HP como no grupo controle, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências alélicas e genotípicas dos grupos analisados ($p = 0,2386$ e $p = 0,1871$, respectivamente).

Já no grupo HF, observou-se freqüência de 0,250 e 0,750 para os alelos CYP3A4*1B e CYP3A4*1A, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre as freqüências alélicas e genotípicas quando comparadas ao GC ($p = 0,8743$ e $p = 0,9875$, respectivamente), e comparadas aos indivíduos brancos do HP ($p = 0,0856$ e $p = 0,1272$, respectivamente).

Tabela 10. Distribuição de genótipos e frequência relativa dos alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 nos indivíduos brancos dos grupos HP e controle.

Grupos	Polimorfismo 5'PR				
	Distribuição de Genótipos			Frequência de Alelos	
	Homozigoto CYP3A4*1A	Heterozigoto	Homozigoto CYP3A4*1B	CYP3A4* 1A	CYP3A4* 1B
GC (90)	77% (69)	20% (18)	3% (3)	0,87	0,13
HP (63)	89% (56)	11% (7)	0% (0)	0,94	0,06
	$\chi^2 = 4,57$ (2 gl, $P = 0,1018$)			$\chi^2 = 2,09$ (1 gl, $P = 0,1479$)	

Número de indivíduos em parênteses; +/- indica presença/ausência do sítio de restrição.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg: HP, $\chi^2 = 0,2180$ (1 gl; $p=NS$).

CG, $\chi^2 = 1,6309$ (1 gl; $p=NS$).

Os indivíduos do grupo HP foram divididos por raça para a análise da distribuição de genótipos e frequência de alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4. Observa-se que a distribuição de genótipos no grupo estudado encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, este grupo de indivíduos também é representativo da população (Tabela 11).

Ao analisar a frequência dos alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4, no grupo HP, observa-se maior frequência do alelo raro CYP3A4*1B em indivíduos de origem negra (0,380) quando comparada a dos indivíduos de origem branca (0,060) ($\chi^2 = 28,0$; 1 gl, $P < 0,0001$). A frequência do genótipo homozigoto variante (CYP3A4*1B) é significativamente mais frequente no grupo de indivíduos de origem negra ($\chi^2 = 27,5$; 2 gl, $P < 0,0001$).

Tabela 11. Distribuição de genótipos e frequência relativa dos alelos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 nos indivíduos do grupo HP, separados pela origem étnica.

Polimorfismo 5'PR					
Grupos	Distribuição de Genótipos			Frequência de Alelos	
	Homozigoto CYP3A4*1A	Heterozigoto	Homozigoto CYP3A4*1B	CYP3A4* 1A	CYP3A4* 1B
Branco	89%	11%	0%	0,94	0,06
(63)	(56)	(7)	(0)		
Negro	36%	52%	12%	0,62	0,38
(25)	(9)	(13)	(3)		
			$\chi^2 = 27,5$ (2 gl, $P < 0,0001$)	$\chi^2 = 28,0$ (1 gl, $P < 0,0001$)	

Número de indivíduos em parênteses; +/- indica presença/ausência do sítio de restrição.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg: Brancos, $\chi^2 = 0,2681$ (1 gl; $p=NS$).

Negros, $\chi^2 = 0,1202$ (1 gl; $p=NS$).

5.3.2. Influência do polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4* sobre o perfil lipídico

As concentrações médias dos parâmetros lipídicos, de acordo com os genótipos do polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4*, dos indivíduos dos grupos HF e HP, estão representadas na figura 8. Devido ao reduzido número de indivíduos com genótipo homozigoto para o alelo raro *CYP3A4*1B*, os dados desses indivíduos foram agrupados com os de genótipo heterozigoto, constituindo o grupo de indivíduos portadores do alelo *CYP3A4*1B*.

Ao comparar os valores de lipídeos séricos entre os indivíduos com alelo selvagem *CYP3A4*1A* (genótipo homozigoto) e os com alelo *CYP3A4*1B* (heterozigotos e homozigotos para o alelo raro), não foram observadas diferenças significantes, para ambos os grupos HF (**Figura 11A**) e HP (**Figura 11B**). Isso indica que o polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4* não está associado com a variabilidade dos lipídeos séricos dos indivíduos hipercolesterolêmicos. Esse resultado já era esperado, já que a enzima *CYP3A4* do citocromo P-450 não atua diretamente no metabolismo lipídico.

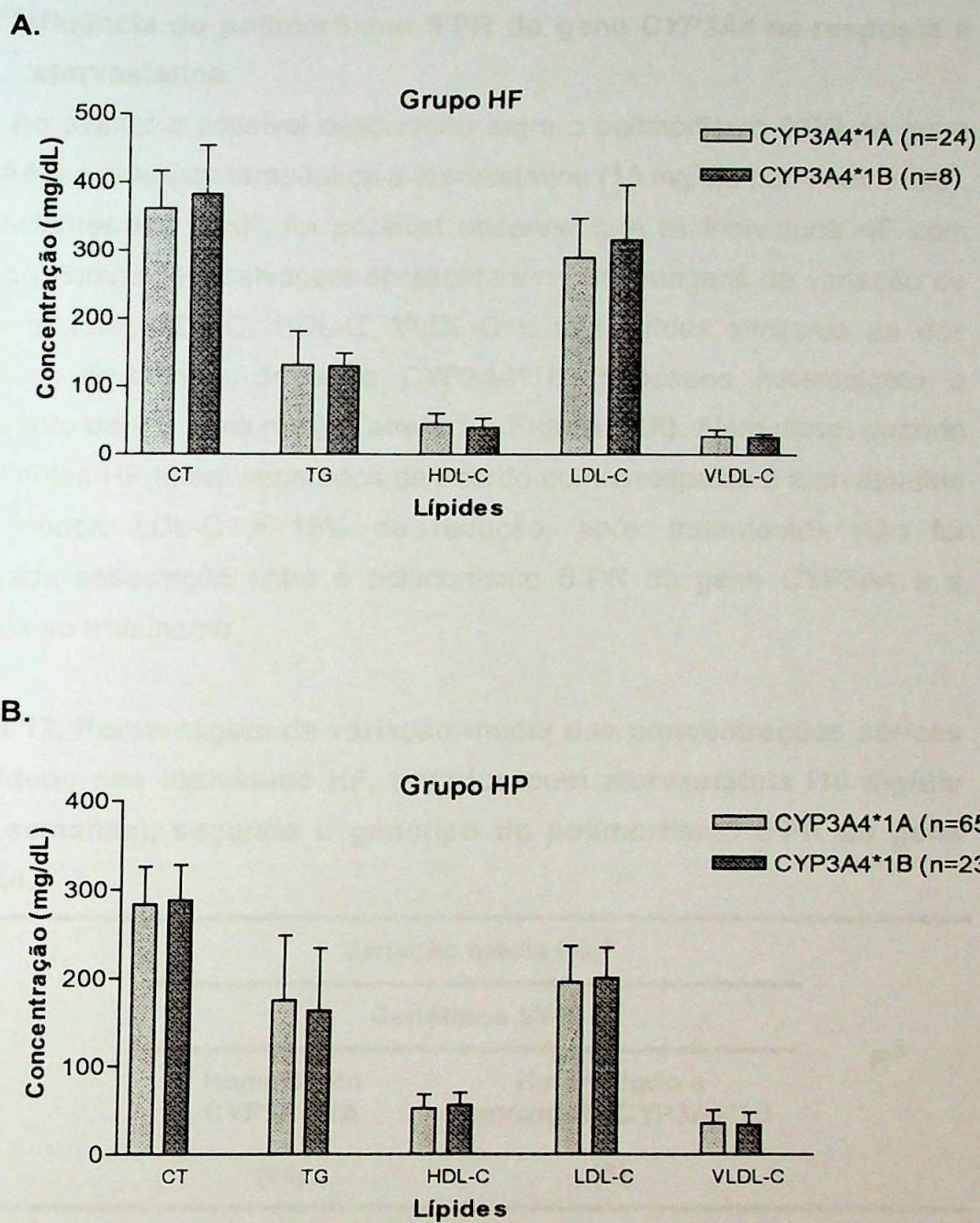


Figura 11. Comparação das concentrações séricas (Média \pm DP) de colesterol total (CT), triglicérides (TG), HDL-C, LDL-C e VLDL-C dos indivíduos dos grupos HF (A) e HP (B), de acordo com os genótipos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4. $P > 0,05$ (teste *t*).

5.3.3. Influência do polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4* na resposta a atorvastatina

Ao avaliar a possível associação entre o polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4* e a resposta terapêutica a atorvastatina (10 mg/dia por 4 semanas), nos pacientes HF e HP, foi possível observar que os indivíduos HF com genótipo homozigoto selvagem apresentaram porcentagens de variação de colesterol total, LDL-C, HDL-C, VLDL-C e triglicérides similares às dos indivíduos portadores do alelo *CYP3A4*1B* (genótipos heterozigoto e homozigoto para o alelo raro) (Tabela 12, Figura 12A). Além disso, quando os pacientes HF foram separados de acordo com a resposta a atorvastatina (respondedor: LDL-C > 15% de redução, após tratamento), não foi observada associação entre o polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4* e a resposta ao tratamento.

Tabela 12. Porcentagem de variação média das concentrações séricas de lipídeos nos indivíduos HF, tratados com atorvastatina (10 mg/dia por 4 semanas), segundo o genótipo do polimorfismo 5'PR do gene *CYP3A4*.

Lípides (mg/dL)	Variação média (%) ^a		<i>P</i> ^b
	Genótipos 5'PR		
	Homozigoto <i>CYP3A4*1A</i> (24)	Heterozigoto e homozigoto <i>CYP3A4*1B</i> (8)	
Colesterol total	-27 ± 13	-24 ± 18	0,5988
Triglicérides	-17 ± 24	-24 ± 14	0,4252
HDL-C	+9 ± 15	+5 ± 14	0,6645
LDL-C	-33 ± 15	-24 ± 18	0,1866
VLDL-C	-16 ± 25	-24 ± 14	0,4329

^a +/- indica aumento/redução; ^b Teste *t* de Student; número de indivíduos entre parênteses; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL.

Com relação aos indivíduos com hipercolesterolemia primária, não foram observadas diferenças significantes, quando comparadas as variações no perfil lipídico, após o tratamento com atorvastatina (10 mg/d, por 4 semanas), entre os indivíduos com alelo selvagem (genótipo homozigoto para CYP3A4*1A) e com alelo CYP3A4*1B (genótipos heterozigoto e homozigoto para o alelo raro) do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 (Tabela 13, Figura 12B).

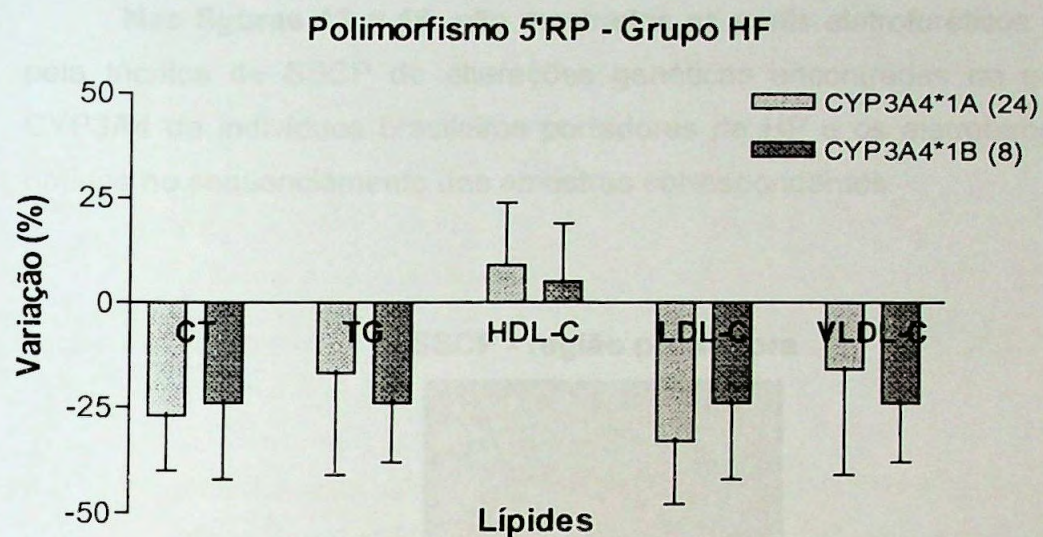
Resultados similares foram observados quando se avaliou o efeito dos genótipos do polimorfismo 5'PR sobre a variação nas concentrações dos parâmetros do perfil lipídico, em indivíduos HP, após tratamento com atorvastatina (20 mg/dia) (dados não mostrados).

Tabela 13. Porcentagem de variação média das concentrações séricas de lipídeos nos indivíduos HP, tratados com atorvastatina (10 mg/dia por 4 semanas), segundo o genótipo do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4.

Lípides (mg/dL)	Variação média (%) ^a		P ^b
	Genótipo 5'PR		
	Homozigoto CYP3A4*1A (65)	Heterozigoto e homozigoto CYP3A4*1B (23)	
Colesterol total	-28 ± 10	-32 ± 10	0,1542
Triglicerídeos	-17 ± 23	-22 ± 18	0,4022
HDL-C	+3 ± 14	-1 ± 16	0,2013
LDL-C	-37 ± 14	-41 ± 13	0,2771
VLDL-C	-17 ± 23	-22 ± 19	0,3906

^a +/- indica aumento/redução; ^b Teste *t* de Student; número de indivíduos entre parênteses; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL.

A.



B.

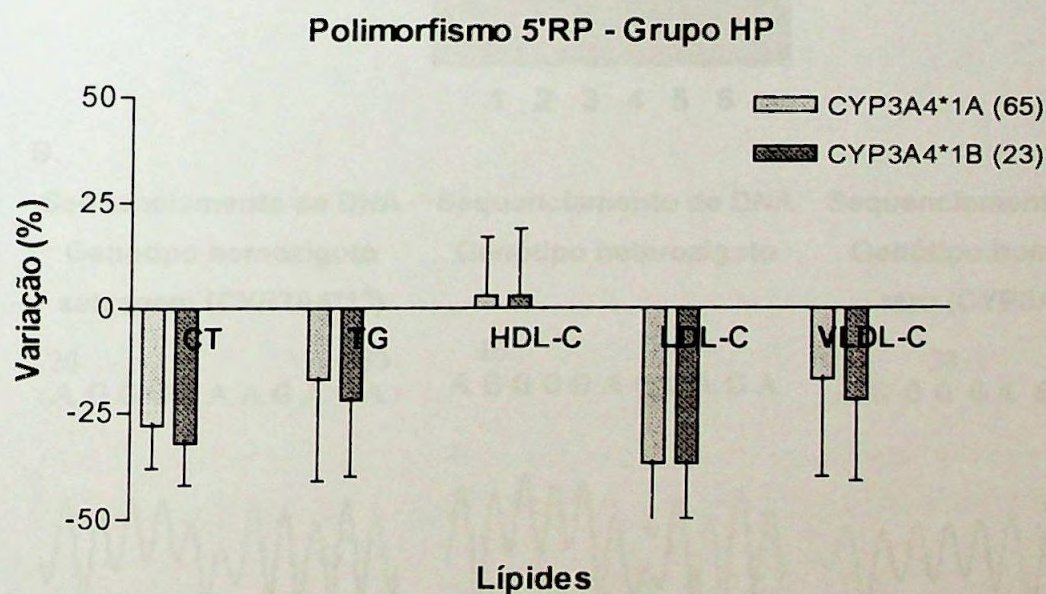


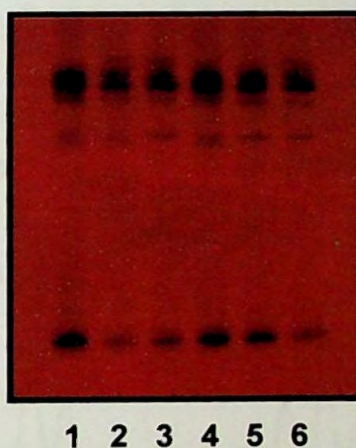
Figura 12. Variação média (%) das concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicérides (TG), HDL-C, LDL-C, VLDL-C, após 4 semanas de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina, de acordo com os genótipos do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 em indivíduos HF (A) e HP (B).

5.4. Alterações moleculares identificadas no gene CYP3A4

Nas figuras 13 a 16, são mostrados os perfis eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP de alterações genéticas encontradas no gene da CYP3A4 de indivíduos brasileiros portadores de HP e os eletroferogramas obtidos no sequenciamento das amostras correspondentes.

A.

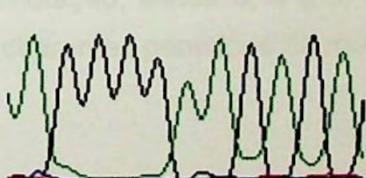
SSCP - região promotora



B.

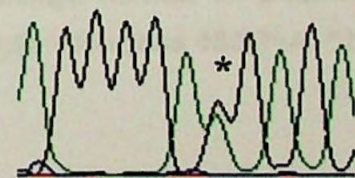
Sequenciamento de DNA
Genótipo homozigoto
selvagem (CYP3A4*1^A)

20 30
A G G G G A A G A G A



Sequenciamento de DNA
Genótipo heterozigoto

10
A G G G G A G G A G A



Sequenciamento de DNA
Genótipo homozigoto
raro (CYP3A4*1^B)

30
A G G G G A G G A G A

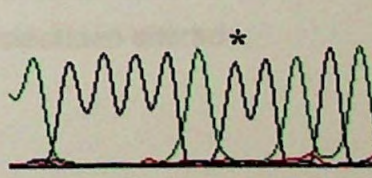
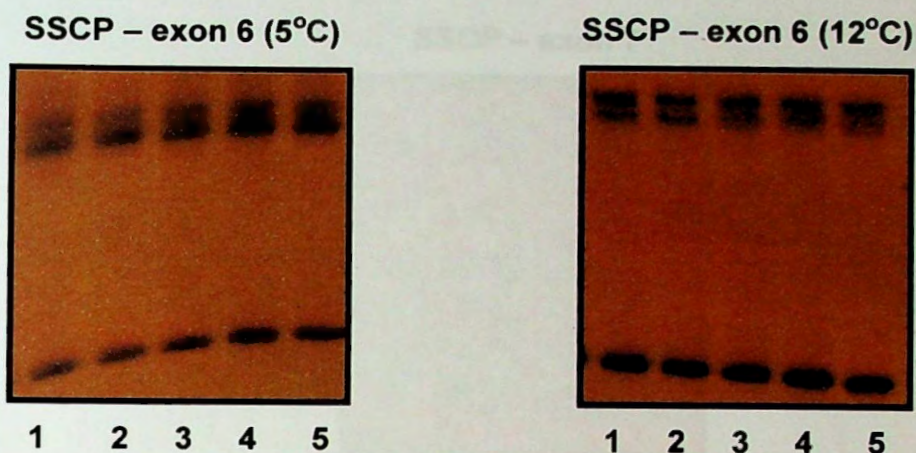


Figura 13. Caracterização molecular do polimorfismo da região promotora 5' do gene da CYP3A4. A. SSCP em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com prata. Linhas 1, 2 e 4: genótipo +/-; linhas 3, 5 e 6: genótipo +/+. B. Sequenciamento de DNA dos três diferentes genótipos do mesmo polimorfismo. * Nucleotídeo alterado.

A.



B.

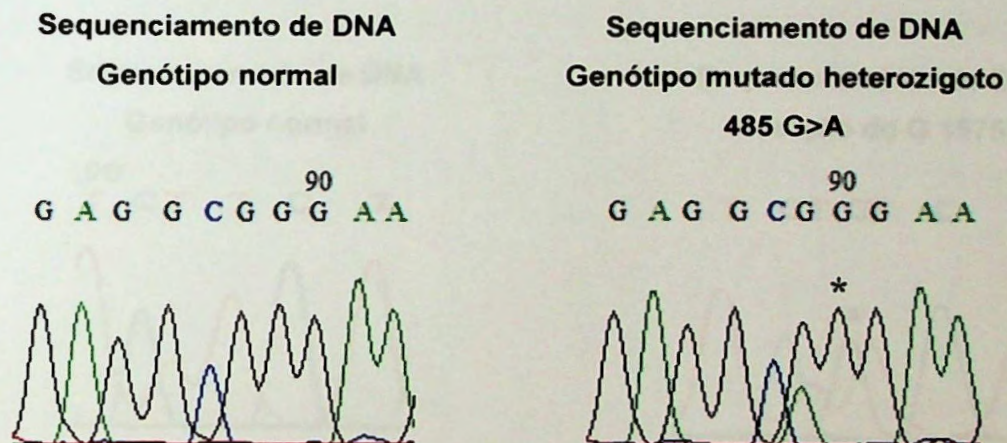
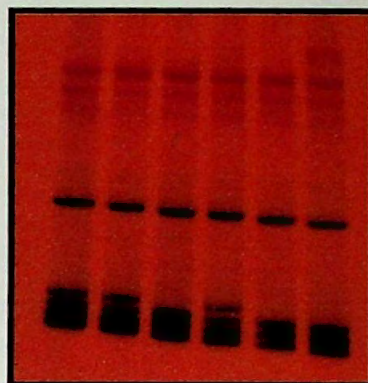


Figura 14. Caracterização molecular da mutação 485G>A do exon 6 do gene da CYP3A4. A. SSCP em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com prata em duas diferentes temperaturas. Linhas 1 e 2: genótipo heterozigoto para a mesma mutação; linhas 3, 4 e 5: genótipo normal. B. Sequenciamento de DNA dos dois diferentes genótipos da mutação silenciosa 485G>A. * Nucleotídeo alterado.

A.

SSCP – exon 7



1 2 3 4 5 6

B.

Sequenciamento de DNA

Genótipo normal

.90
T C T T C T

Sequenciamento de DNA

Inserção do G 15752

T C T G T C T

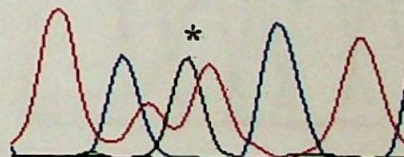
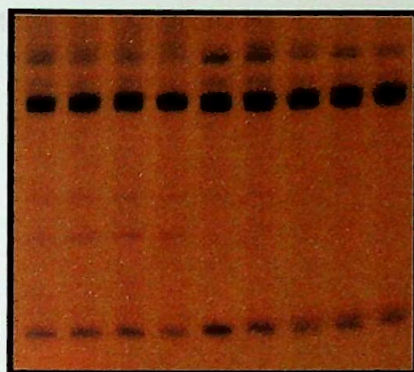


Figura 15. Caracterização molecular da alteração molecular do exon 7 do gene da CYP3A4. A. SSCP em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com prata. Linhas 1, 2 e 4: perfis eletroforéticos alterados para o exon 7; linhas 3, 5 e 6: perfis eletroforéticos normais para o exon 7. B. Sequenciamento de DNA da alteração molecular encontrada no exon 7 do gene da CYP3A4. * Nucleotídeo alterado.

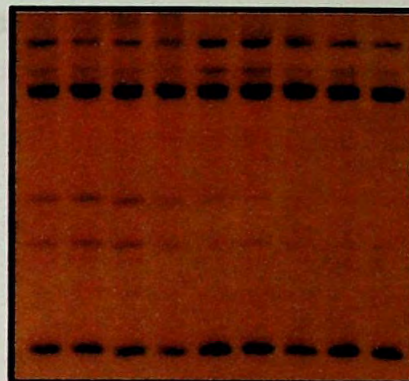
A.

SSCP – exon 11 (5°C)



1 2 3 4 5 6 7 8 9

SSCP – exon 11 (12°C)



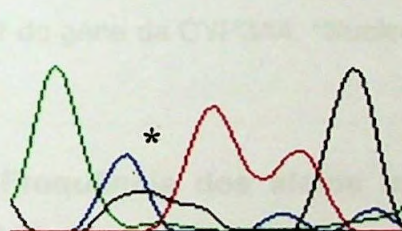
1 2 3 4 5 6 7 8 9

B.

Sequenciamento de DNA

Genótipo mutado heterozigoto 1117 C>G

80
A C G T T G



Sequenciamento de DNA

Genótipo mutado heterozigoto 1121 A>C

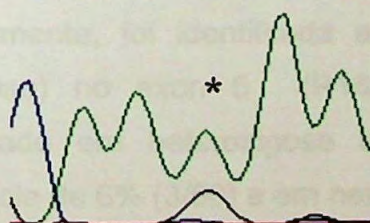
T T G A G A G



Sequenciamento de DNA

Genótipo mutado heterozigoto 1134 A>G

C A A A A



Sequenciamento de DNA

Genótipo mutado heterozigoto 1139 A>C

100
A A G A T



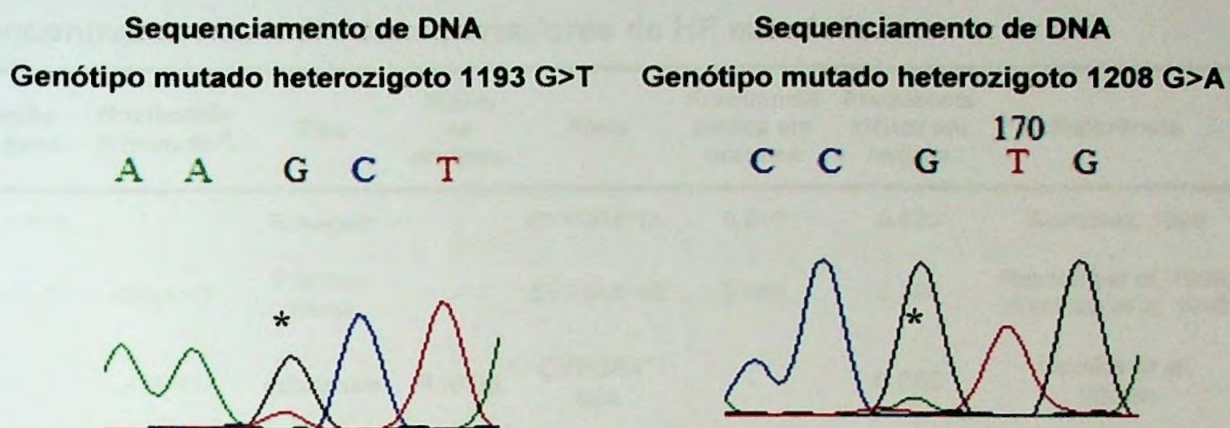


Figura 16. Caracterização molecular das alterações moleculares do exon 11 do gene da CYP3A4. A. SSCP em gel de poliacrilamida a 12,5% corado com prata em duas diferentes temperaturas. Linhas 1 a 4: perfis eletroforéticos alterados para o exon 11; linhas 5 a 9: perfis eletroforéticos normais para o exon 11. B. Sequenciamento de DNA das diferentes alterações moleculares encontradas no exon 11 do gene da CYP3A4. *Nucleotídeo alterado.

5.4.1. Frequência dos alelos mutados da região codificante do gene CYP3A4

Na **Tabela 14** estão resumidas as características de 8 alterações detectadas no gene da enzima CYP3A4 por SSCP e confirmadas pela técnica de sequenciamento de DNA, nos indivíduos estudados. Além do polimorfismo da região 5' promotora do gene da CYP3A4, já relatado anteriormente, foi identificada a mutação de troca de único nucleotídeo (*missense*) no exon 6 (R162Q, alelo CYP3A4*15A). Esse alelo foi encontrado em heterozigose em três indivíduos da raça negra, com frequência de 6% (3/50) e em nenhum indivíduo da raça branca.

Tabela 14. Alterações genéticas identificadas no gene da CYP3A4 encontradas nos indivíduos portadores de HP estudados.

Região do gene	Nucleotídeo trocado ^a	Tipo	Efeito na proteína	Alelo	Frequência alélica em brancos	Frequência alélica em negros	Referência
Promotor	-	Selvagem	-	CYP3A4*1A	0.940	0.620	Gonzalez, 1998
Promotor	-290A>G	Polimorfismo	-	CYP3A4*1B	0.060	0.380	Rebbeck <i>et al</i> , 1998; Westlind <i>et al</i> , 1999
Exon 6	c.485G>A	<i>missense</i>	R162Q	CYP3A4*15A	-	0.060	Lamba <i>et al</i> , 2002b
Intron 7	15752insG	intrônica	-	-	0.060	0.380	Mutação nova**
Exon 11	c.1117C>G	<i>missense</i>	L373V	-	0.008	0.040	Mutação nova**
Exon 11	c.1121A>C	<i>missense</i>	E374A	-	0.016	0.060	Mutação nova**
Exon 11	c.1134A>G	silenciosa	-	-	0.016	0.040	Mutação nova**
Exon 11	c.1139A>C	<i>missense</i>	D380A	-	0.008	0.040	Mutação nova**
Exon 11	c.1193G>T	<i>missense</i>	S398I	-	0.016	0.040	Mutação nova**
Exon 11	c.1208G>A	<i>missense</i>	A403H	-	0.016	0.040	Mutação nova**

^a Nucleotídeos identificados de acordo com Hashimoto *et al.* (1993); ^{b,c} Mutações detectadas no mesmo alelo; [#]Nomenclatura segundo as recomendações de Den Dunnen & Antonarakis (2000); ^{**}Não descrita no site <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm>

Identificou-se a inserção de guanina (G) no nucleotídeo 15752 do intron 7 (15752insG) ainda não descrita na literatura (**tabela 14**). Essa alteração foi detectada na mesma frequência (0,060 e 0,380 em brancos e negros, respectivamente) e nos mesmos indivíduos portadores do alelo CYP3A4*1B, em homozigose ou heterozigose.

Foram identificadas 6 novas mutações no exon 11, sendo 1 mutação silenciosa e outras 5 mutações *missense*. Entre as mutações no exon 11, c.1121A>C (E374A) foi identificada em 5 indivíduos (0.028), enquanto as mutações c.1139A>C (D380A) e c.1208G>A (A403H) foram encontradas em 4 pacientes portadores de HP (0.023). As variantes alélicas c.1117C>G (L373V), c.1134A>G (silenciosa) e a c.1193G>T (S398I) foram observadas em 3 indivíduos (0.017). Entre esses indivíduos, 3 deles eram portadores

das 6 mutações encontradas no exon 11 do gene da CYP3A4, concomitantemente.

A mutação c.1117C>G tem a mesma localização da mutação já descrita por Eiselt *et al.* (2001), c.1117C>T (alelo variante CYP3A4*12), porém com troca nucleotídica diferente.

As freqüências alélicas observadas para as mutações no exon 11 variaram entre 0,008 a 0,060 nos indivíduos estudados (Tabela 14). Observou-se maior freqüência desses alelos variantes entre os indivíduos da raça negra (0,260) do que entre os brancos (0,080) ($\chi^2= 6.19$; 1g/; $p=0.0129$).

5.4.2. Influência das mutações encontradas na região codificante do gene CYP3A4 na resposta a atorvastatina

Na tabela 15 pode-se observar a variação de colesterol total e LDL-C após tratamento com 10mg de atorvastatina durante 4 semanas, dos indivíduos portadores de mutações em regiões codificantes do gene da enzima.

Entre os indivíduos portadores de mutações no exon 11, observou-se diminuição de LDL-C que variou entre 48 to 62%. Interessantemente, o indivíduo cuja resposta a atorvastatina atingiu redução de 62% nas concentrações de LDL-C era portador de mutações no exon 6 e no exon 11 do gene da CYP3A4.

Um dos indivíduos portadores das 6 mutações concomitantes, de origem negra, foi excluído do estudo, pois apresentava altas concentrações de ALT sérica. Os outros indivíduos portadores destas mutações apresentaram valores basais de ALT que variaram entre 15 e 19 U/L e após tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4sem entre 18 e 24 U/L (valor de referência até 41 U/L), enquanto para as concentrações plasmáticas de CPK variaram entre 21 e 140 U/L, e 24 e 81 (U/L) (valor de referência até 170

U/L) nas condições basais e após 10mg/dia/4sem de atorvastatina, respectivamente.

Outros dois indivíduos, também portadores de 6 mutações no exon 11, apresentaram redução significativa da LDL-C que variou entre 48 e 53% para 10 mg/dia (Tabela 15) e 64 e 69% para 20 mg/dia de atorvastatina. É importante observar que nenhum dos pacientes, com exceção do que foi excluído do estudo, apresentou alterações significativas nas concentrações de ALT e CK, parâmetros usados na monitorização da segurança do tratamento com vastatinas.

Tabela 15. Varaintes genéticos observados na região codificante do gene CYP3A4 e porcentagem de variação de colesterol total e LDL-C na resposta a atorvastatin 10mg/dia em indivíduos hipercolesterolêmicos

Indiví- duos	Cor	Sexo	Presença de CYP3A4*1B	Mutações no exon 6	Mutações no exon 11	Varição no CT (%) ^a	Varição no LDL-C (%) ^a
01	Negro	F	Heterozigoto	CYP3A4*15A	-	-28	-39
02	Negro	F	Homozigoto	CYP3A4*15A	-	-19	-22
03	Negro	F	Homozigoto	CYP3A4*15A	c.1121A>C	-47	-62
04	Branco	F	Não	-	c.1121A>C; c.1134A>G; c.1193G>T; c.1208G>A	-37	-49
05	Branco	F	Não	-	c.1117C>G; c.1121A>C; c.1134A>G; c.1139A>C; c.1193G>T; c.1208G>A	-32	-48
06	Negro	F	Heterozigoto	-	c.1117C>G; c.1121A>C; c.1134A>G; c.1139A>C; c.1193G>T; c.1208G>A	-39	-53
07	Negro	F	Heterozigoto	-	c.1117C>G; c.1121A>C; c.1134A>G; c.1139A>C; c.1193G>T; c.1208G>A	Deixou o estudo	

^a +/- indica aumento/redução; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol da LDL.

O efeito da presença das mutações no exon 11, comparado com a ausência dessas mutações na resposta terapêutica a atorvastatin pode ser observado na Tabela 16. Observa-se que os indivíduos portadores das mutações nesse exon apresentam reduções significativamente maiores nas concentrações de LDL-C ($p < 0.05$), além de aumento, também significativo

($p < 0.05$), nas concentrações de HDL-C, quando comparados aos indivíduos não-portadores de mutações no exon 11, após tratamento durante 4 semanas com atorvastatina 10mg/dia (Figure 14).

Table 16. Efeito das mutações no exon 11 do gene da CYP3A4 na resposta terapêutica a atorvastatina 10 mg/dia e 20 mg/dia em indivíduos hipercolesterolemicos

Lípides ^a	Resposta terapêutica a atorvastatina (% de variação) ^b					
	Basal x 10 mg/dia		Basal x 20 mg/dia		10 mg/dia x 20 mg/dia	
	Presença (4)	Ausência (74)	Presença (4)	Ausência (74)	Presença (4)	Ausência (74)
CT	-39 ± 6	-29 ± 10	-43 ± 13	-34 ± 10	-7 ± 19	-8 ± 10
TG	-29 ± 22	-18 ± 22	-33 ± 31	-23 ± 22	-9 ± 28	-4 ± 27
HDL-C	+18 ± 29	+2 ± 14	+19 ± 26	+ 4 ± 18	+2 ± 14	+2 ± 11
LDL-C	-53 ± 7	-38 ± 13	-59 ± 12	-46 ± 12	-12 ± 23	-12 ± 14
VLDL-C	-29 ± 22	-18 ± 21	-32 ± 32	-23 ± 22	-8 ± 29	-4 ± 27
	Basal vs. 10mg/dia ^c		Basal vs. 20mg/dia		10 mg/dia vs. 20mg/dia	
CT	0,0660		0,1304		0,8357	
TG	0,3063		0,3941		0,7054	
HDL-C	0,0337		0,1089		0,9989	
LDL-C	0,0219		0,0511		0,9580	
VLDL-C	0,3236		0,4268		0,7318	

Número de indivíduos entre parêntesis

^a Abreviações: CT, colesterol total; TG, triglicerídeos; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL. ^b +/- indica aumento/redução ^c Teste *t Student*.

5. DISCUSSÃO

Pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina demonstram um aumento das respostas terapêuticas, proporcionando reduções do LDL-C variando entre 15 a 35%, dependendo da dose e do tratamento.

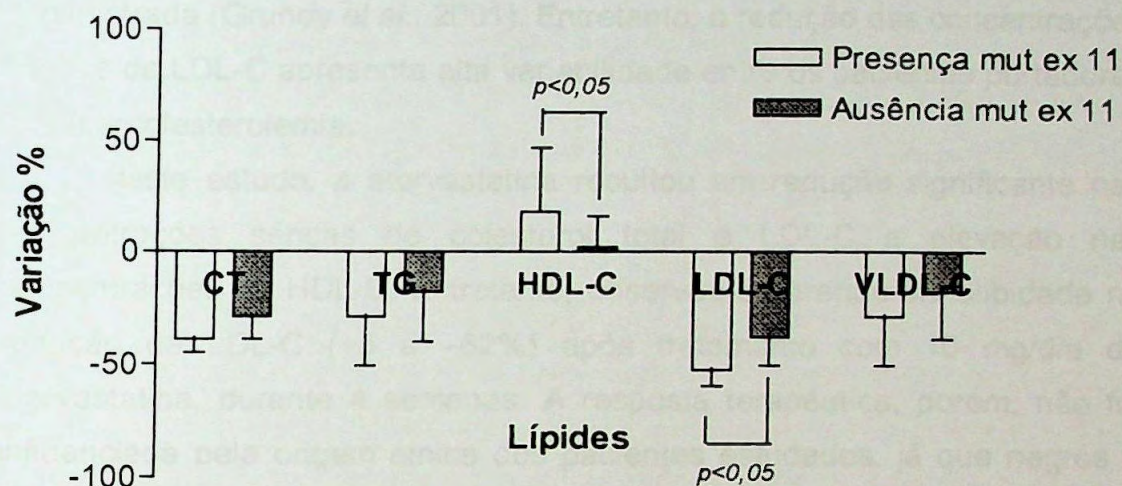


Figura 14. Porcentagem de variação (média ± DP) das concentrações de lipídios nos indivíduos hipercolesterolêmicos com presença ou ausência de mutações no exon 11 do gene da CYP3A4, após tratamento com atorvastatina 10 mg/dia. CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL. Teste *t* Student.

6. DISCUSSÃO

Pacientes hipercolesterolêmicos tratados com vastatinas geralmente apresentam boa resposta terapêutica, proporcionando reduções de LDL-C que variam entre 18 a 55%, dependendo da dose e da vastatina administrada (Grundy *et al.*, 2001). Entretanto, a redução das concentrações séricas de LDL-C apresenta alta variabilidade entre os pacientes portadores de hipercolesterolemia.

Neste estudo, a atorvastatina resultou em redução significativa nas concentrações séricas de colesterol total e LDL-C e elevação nas concentrações de HDL-C. Entretanto, observou-se grande variabilidade na redução de LDL-C (+5 a -62%) após tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina, durante 4 semanas. A resposta terapêutica, porém, não foi influenciada pela origem étnica dos pacientes estudados, já que negros e brancos apresentaram redução semelhante nas concentrações de colesterol total e LDL-C. Este achado é concordante com os grandes estudos clínicos, como o 4S, AFCAPS/TexCAPS e outros, que mostraram redução similar nas concentrações de LDL-C entre milhares de indivíduos tratados com vastatinas, de diferentes origens étnicas (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Downs *et al.*, 1998).

Comparando-se os indivíduos portadores de HF e HP não se observou diferenças na média da redução da LDL-C, em ambos os grupos de indivíduos respondedores tratados com atorvastatina 10mg/dia/4sem. Observa-se, porém, maior quantidade de indivíduos não-respondedores entre os portadores de HF do que entre os portadores de HP. Este fato, como dito anteriormente, pode estar ligado a variabilidade genética não apenas relacionada ao RLDL, bem como a outros genes, como a apo E. O'Neill e cols. (2001), observaram maior frequência do alelo $\epsilon 4$ em indivíduos portadores de HF não-respondedores ao tratamento com vastatinas. Outros estudos com portadores de HF e HP também sugerem que indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam menor redução nas

concentrações de LDL-C, quando tratados com vastatinas do que os portadores dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ (Carmena *et al.*, 1993; Salazar *et al.*, 2001a)

Até o momento, os mecanismos pelos quais essas variações genéticas influenciam as concentrações de colesterol e a resposta terapêutica as vastatinas não foram elucidados. É provável que esses polimorfismos sejam segregados juntamente com uma mutação funcional no gene RLDL. A influência de mutações do gene RLDL na resposta terapêutica as vastatinas tem sido amplamente documentada (Sun *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 1999; Real *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2001; Brorholt-Petersen *et al.*, 2001).

Entre os portadores de HP que seguiram esquema terapêutico com 10 mg/d e 20 mg/d de atorvastatina durante 4 semanas, observou-se média de redução de LDL-C de 40 e 47%, respectivamente, mostrando que o dobro da dose do medicamento não corresponde à duplicação da resposta, medida pela diminuição das concentrações de LDL-C. Esta característica foi observada em todos os estudos realizados com vastatinas em diferentes doses (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Downs *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1995; Illingworth *et al.*, 1994; Blum, 1994; Nawrochi *et al.*, 1995; Farnier & Davignon, 1998). Esta observação, porém, é importante na prática clínica diária de Cardiologistas e Endocrinologistas, que podem lançar mão de associações terapêuticas, como é o exemplo da associação das vastatinas com o Ezetimibe, para melhorar a resposta terapêutica de indivíduos que não atingem reduções satisfatórias de LDL-C e que podem ser mais suscetíveis aos efeitos adversos causados pelas vastatinas.

Outras associações que podem ser interessantes no tratamento com vastatinas de indivíduos hipercolesterolêmicos, porém que necessitam ser rigidamente acompanhadas, é a administração concomitante de inibidores (diltiazem, itraconazol, cetoconazol, eritromicina, benzodiazepínicos, ritonavir, verapamil, "grape fruit", entre outros) e competidores (cafeína, vinblastina, lidocaína, etc.) da enzima CYP3A4, que metaboliza algumas vastatinas (lovastatina, sinvastatina e atorvastatina) (Bottorf, 1999a; Bottorf, 1999b.). Tais associações podem promover reduções satisfatórias de LDL-C com

baixas doses de vastatinas, porém, se mal administradas, podem também levar a maior frequência de efeitos adversos.

Neste estudo, foram investigadas mutações na região promotora e codificante do gene CYP3A4, com a finalidade de identificar sua possível associação com as diferenças na resposta terapêutica a atorvastatina.

Ao analisar a região promotora, a frequência do alelo raro CYP3A4*1B dos indivíduos brancos com hipercolesterolemia primária (0,056) foi similar a do grupo controle (0,130) e foi inferior a encontrada nos negros hipercolesterolêmicos (0,380). Estas frequências são similares às encontradas em indivíduos brancos (0,020 a 0,133) e negros (0,350 a 0,670) do Brasil (Cavalli *et al.*, 2001) e dos Estados Unidos, além de alguns países europeus (Rebbeck *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999; Sata *et al.*, 2000; Amirinami *et al.*, 1999; Westlind *et al.*, 1999; Wandel *et al.*, 2000).

Entre os indivíduos HF, observou-se maior frequência do alelo raro (0,25) em indivíduos brancos, porém esta diferença não se mostrou significativa, quando comparada às frequências encontradas no grupo HP e controle.

As frequências do alelo raro CYP3A4*1B em nossa população de brancos são semelhantes à de indivíduos suecos, holandeses, espanhóis, australianos, e americanos brancos e hispânicos, cujas frequências do alelo CYP3A4*1B variam de 0,030 a 0,093 (Ball *et al.*, 1999; Sata *et al.*, 1999; Westlind *et al.*, 1999; Rivory *et al.*, 2000; Van Schaik *et al.*, 2000; Garcia-Martin, *et al.*, 2002). Por outro lado, as frequências desse alelo nos indivíduos brancos de nossa população são superiores a de populações asiáticas (Ball *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2002; Lamba *et al.*, 2002a; Chowbay *et al.*, 2003).

Além disso, a alta frequência do alelo CYP3A4*1B em negros, encontrada em nosso estudo, foi também observada em indivíduos negros africanos e de diferentes estados americanos (frequências entre 0,540 e 0,670) (Ball *et al.*, 1999; Sata *et al.*, 1999; Wandel *et al.*, 2000; Lamba *et al.*, 2002a).

O alelo raro CYP3A4*1B não afetou o perfil lipídico basal e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4sem). A falta de associação entre o alelo CYP3A4*1B e a variação na resposta a atorvastatina está de acordo com os achados em outros estudos que também não observaram efeito da presença do alelo variante CYP3A4*1B no metabolismo de outros fármacos, como eritromicina, midazolam e ciclosporina (Ball *et al.*, 1999; Wandel *et al.*, 2000; von AhnSEN *et al.*, 2001). Esses resultados indicam que o polimorfismo 5'PR não está associado com a resposta a atorvastatina, em pacientes com hipercolesterolemia familiar ou não-familiar. Em alguns estudos, foi observado que o polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 não está associado com a expressão hepática da enzima (Westlind *et al.*, 1999). Também não foi encontrada relação entre o polimorfismo 5'PR e a atividade da CYP3A4, estimada pela depuração da ciclosporina (Rivory *et al.*, 2000). Por outro lado, foi observado que indivíduos Afro-americanos com genótipo homozigoto para o alelo CYP3A4*1B apresentavam 30% menor depuração sistêmica do midazolam que os homozigotos para o alelo selvagem (Wandel *et al.*, 2000). Esses dados indicam que o efeito do polimorfismo 5'PR do gene CYP3A4 sobre a atividade da enzima ainda não foi completamente estabelecido e parece depender da variação na freqüência de alelos que se observa entre as populações (Wandel *et al.*, 2000).

Interessantemente, o alelo variante encontrado no intron 7 foi observado nos mesmos indivíduos portadores do alelo CYP3A4. Essa alteração intrônica e sua associação com o alelo CYP3A4*1B. Assim, existe a hipótese de que os alelos variantes na região promotora, bem como no intron 7, tenham sido segregadas juntamente, aparecendo concomitantemente nos indivíduos estudados.

As mutações CYP3A4*2, CYP3A4*5, CYP3A4*16 e CYP3A4*17, já descritas para o éxon 7 do gene CYP3A4, não foram detectadas nos indivíduos do nosso estudo. Isso provavelmente se deve às baixas freqüências dessas mutações em brancos (0 a 2,7%) e negros (0%) (Sata *et al.*, 2000). As maiores freqüências encontradas destas mutações foram

observadas em indivíduos japoneses (5%) e mexicanos (5%) (Lamba *et al.*, 2002).

Na análise para verificar a influência desta variante genética e a resposta a atorvastatina, da mesma forma que com o alelo CYP3A4*1B, também não se pode estabelecer associação da presença do mesmo e a variabilidade na resposta a atorvastatina.

Na análise da região codificante do gene CYP3A4, nenhuma mutação no gene da CYP3A4 foi encontrada entre os indivíduos do grupo HF. A mutação R162Q (alelo CYP3A4*15A), previamente descrita no exon 6 por Dai e cols. (2001) e Lamba e cols. (2002), foi encontrada em apenas três indivíduos negros HP. A frequência relativa do alelo CYP3A4*15A (0,060) no nosso grupo de estudo é similar à encontrada em negros americanos (0,02 a 0,042). Além disso, esse alelo não foi observado nos pacientes brancos HP e em caucasianos e asiáticos de outros países (Lamba *et al.*, 2002b; Dai *et al.*, 2001). Entre os três indivíduos portadores do alelo CYP3A4*15A, apenas um era heterozigoto para o alelo CYP3A4*1B, enquanto os outros dois eram homozigotos para tal alelo variante da região promotora.

As frequências das mutações no éxon 11 encontradas individualmente em brancos no nosso estudo (0,008 a 0,016) foram similares à dos indivíduos negros (0,040 a 0,060), bem como às frequências encontradas no mesmo exon no estudo de Eiselt e cols. (2001), identificadas em 150 indivíduos caucasianos alemães e suíços - CYP3A4*11, (T363M), CYP3A4 *12 (L373F) e CYP3A4*13 (P416L) - com frequências de 0,0034.

Considerando o efeito das variantes alélicas encontradas no nosso estudo sobre a resposta terapêutica à atorvastatina, os indivíduos portadores do alelo CYP3A4*15A apresentaram redução nas concentrações de LDL-C entre 22 e 62% após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4sem) e entre 49 e 68%, após tratamento com 20 mg/dia/4sem. Devido ao reduzido número de pacientes portadores desse alelo não foi possível associar a resposta a atorvastatina ao alelo CYP3A4*15A. Desse modo, não se pode afirmar que a mutação influenciou a resposta terapêutica a atorvastatina, e seria necessário aumentar o número de indivíduos pesquisados para a

identificação de mais portadores, tornando possível a verificação da associação deste alelo variante CYP3A4*15A e a resposta a vastatinas metabolizadas via CYP3A4. Entretanto, Lamba e cols. (2002b) também não observaram associação entre o alelo CYP3A4*15A e a variação na atividade da enzima no processo de hidroxilação do midazolam, como também não observaram diferenças na expressão hepática do alelo em questão.

A associação encontrada entre as mutações no éxon 11 do gene CYP3A4 e a maior resposta ao tratamento com atorvastatina sugere que essas mutações podem estar afetando a atividade da enzima CYP3A4, promovendo uma concentração elevada de atorvastatina no plasma durante a terapia. Tais mutações estão localizadas entre os aminoácidos 373 e 403 da proteína, no sítio 5 de reconhecimento dos substratos (SRS-5), bem como na região de ligação com o grupo heme da CYP3A4.

He e cols. (1997) investigaram a importância de cada aminoácido individualmente, entre as posições 364 e 377 da CYP3A4 e sugeriram que a região conservada e com resíduos de arginina entre os aminoácidos 365 e 375 deve ser extremamente importante na estabilização da estrutura terciária ou na ligação com o grupo heme da proteína. Além disso, esses autores também sugeriram que os resíduos 369, 370 e 373 são importantes na determinação da especificidade do substrato. Interessantemente, a substituição L373H resultou na produção de um novo metabólito da progesterona e testosterona (He *et al.*, 1997).

Eiselt e cols. (2001) demonstraram que o alelo variante CYP3A4*12 (L373F) está associado ao aumento na atividade de hidroxilação da testosterona em experimentos "in vitro", mas não tem efeito sobre debenzilação, hidroxilação e oxidação de outros substratos da CYP3A4, o 7-Benzyloxy-4-(trifluoromethyl) coumarin (7-BFC), a progesterona e o midazolam, respectivamente.

Assim, sugere-se que as novas mutações no éxon 11 descritas neste estudo, principalmente a L373V, possam afetar a conformação da enzima e dificultar o acesso ao substrato. Isso reduziria a taxa de biotransformação da atorvastatina em seus metabólitos, aumentando o tempo de permanência no

compartimento sanguíneo e conseqüentemente a melhor resposta ao tratamento com atorvastatina.

Outro possível mecanismo é a biotransformação da atorvastatina em outro metabólito, com maior atividade inibitória da HMG CoA redutase, como descrito por He e cols. (1997) para o variante L373H no metabolismo da progesterona e testosterona. Outros estudos, porém deverão ser feitos para confirmar essas hipóteses.

Três indivíduos do grupo HP (total de 88), sendo 2 brancos e 1 negro tiveram elevações de ALT, mas em valores aceitáveis para o tratamento com vastatinas. Essas elevações discretas podem ter origens várias, decorrentes de qualquer pequena lesão nas células hepáticas, que podem ser por hábitos alimentares, ingestão de álcool, entre outros motivos, porém, até o momento se desconhece o mecanismo pelo qual as vastatinas promovem o aumento de enzimas hepáticas.

Entre os pacientes portadores das mutações no exon 11 apenas 1, teve alterações importantes de ALT, enquanto nenhum deles teve alteração importante de CK. Assim, um fato relevante é que um dos pacientes portadores das seis mutações no éxon 11 encontradas no gene CYP3A4 foi retirado do estudo após o primeiro período de tratamento (atorvastatina 10 mg/dia), por apresentar concentrações de ALT superiores a três vezes o limite superior de referência (LSR) (Bertolini *et al.*, 1997; Bernini *et al.*, 2001; Pasternak *et al.*, 2002). Este paciente estava em tratamento concomitante com Omeprazol e Cumarine, fármacos sabidamente inibidores da enzima CYP3A4 (Wrighton & Stevens, 1992). Aumento na resposta terapêutica e manifestações de efeitos adversos foram demonstrados em vários estudos em indivíduos com administração simultânea de inibidores e competidores da CYP3A4 (Neuvonen *et al.*, 1998; Neuvonen & Jalava, 1996). Assim, o efeito colateral manifestado pelo paciente poderá estar relacionado à reduzida atividade da CYP3A4 promovida pela presença das mutações no éxon 11, bem como pela inibição atribuída ao Omeprazol e ao Cumarine (Wrighton & Stevens, 1992).

Já para a CK, observou-se elevação pouco relevantes, de até 2,4 vezes o valor do LSR para esta enzima, em 12 indivíduos, já que o aceitável no tratamento com vastatinas é de 10 vezes. Entre eles, apenas um era portador dos alelos variantes do éxon 11, bem como dos alelos CYP3A4*1B e CYP3A4*15A. Entre os outros 11, seis eram portadores heterozigotos e cinco homozigotos para o alelo CYP3A4*1A (selvagem). Essas pequenas elevações nas concentrações da CK plasmática, entretanto, podem ter sido causadas por aumento na atividade física dos indivíduos estudados.

Neste estudo, nós propomos que as mutações do éxon 11 do gene CYP3A4 podem estar associadas à redução da atividade enzimática, levando a diminuição da metabolização da atorvastatina nos indivíduos hipercolesterolêmicos estudados, o que poderia estar contribuindo para um aumento na resposta terapêutica, bem como, no aumento dos efeitos adversos. Portanto, a identificação de alterações moleculares no gene CYP3A4 poderá contribuir na escolha da vastatina a ser utilizada para tratamento da hipercolesterolemia, já que nem todas são metabolizadas via CYP3A4, bem como no ajuste das doses desses hipolipemiantes metabolizados pela CYP3A4, promovendo maior eficácia terapêutica e reduzindo e/ou prevenindo efeitos adversos potenciais em indivíduos suscetíveis.

7. CONCLUSÕES

- A frequência relativa do alelo CYP3A4*1B da região promotora do gene CYP3A4 em indivíduos brancos e negros brasileiros é similar a de indivíduos brancos e negros de outras populações.
 - A frequência relativa do alelo CYP3A4*15A do éxon 6 do gene CYP3A4 em indivíduos negros brasileiros é similar a de indivíduos negros americanos.
 - A resposta ao tratamento com atorvastatina de indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar e hipercolesterolemia primária não parece ser influenciada pela presença dos alelos CYP3A4*1B e CYP3A4*15A e a mutação nova 15752insG (intron 7) do gene CYP3A4.
 - A presença de mutações novas identificadas no éxon 11 do gene CYP3A4 nos indivíduos portadores de hipercolesterolemia primária parece influenciar a resposta a atorvastatina.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- AHN, Y.I., KASBAH, I.M., ASTON, C.E., FERRELL, R.E., HAMMAN, R.F. Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.14, n.5, p.663-670, 1994.
- ALBERTS, A.W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMANN, C., ROTHROCK, J., LOPEZ, M., JOSHUA, H., HARRIS, E., PATCHETT, A., MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY E., ALBERS-SCHONBERG, G., HENSEN, O., HIRSHFIELD, J., HOOGSTEEN, K., LIESCH, J., SPRINGER, J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase, and a cholesterol lowering agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.3957-3961, 1980.
- ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G., RICHMOND, W., FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.20, p.470-475, 1974.
- AVARIAM, M., DANKNER, G., COGAN, U. Lovastatin inhibits LDL oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies. **Metabolism**, v.41, p.229-235, 1992.
- BAE, C.Y., KEENAN, J.M., WENZ, J., McCAFFREY, D.J. A clinical trial of the American Heart Association step one diet for treatment of hypercholesterolemia. **J. Fam. Pract.**, v.33, n.3, p.249-254, 1991.
- BAILEY, D.G., ARNOLD, J.M.O., BEND, J.R. Grapefruit juice-felodipine interaction: reproducibility and characterization with the extended release drug formulations. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.40, p.135-140, 1995.
- BAKKER-ARKEMA, R., FAYYAD, R., DAVIDSON, M. One year study comparing the safety and efficacy of atorvastatin to that of lovastatin. Paper presented at **66th Congress of the European Atherosclerosis Society**. Florence, Italy. 1996.
- BAKKER-ARKEMA, R.G., NAWROCKI, J.W., BLACK, D.M. Safety profile of atorvastatin-treated patients with low LDL-cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v.149, p.123-129, 2000.

* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1998.

- BALL, S.E., SCATINA, J., KAO, J., FERRON, G.M., FRUNCILLO, R., MAYER, P., WEINRYB, I., GUIDA, M., HOPKINS, P.J., WARNER, N., HALL, J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promotor region of CYP3A4. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.66, p.288-294, 1999.
- BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weiberg. In: **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. cap.7, p.179-202.
- BENTON, R.E., HONIG, P.K., ZAMANI, K. Grapefruit juice alters terfenadine pharmacokinetics, resulting in prolongation of repolarization on the electrocardiogram. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.59, p.383-388, 1996.
- BERNINI, F., POLI, A., PAOLETTI, R. Safety of HMG-CoA reductase inhibitors: focus on atorvastatin. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 15, p. 211-218, 2001.
- BERTILSSON, G.; BERKENSTAM, A.; BLOMQUIST, P. Functionally conserved xenobiotic responsive enhancer in cytochrome P4503A7. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.280, p.139-144, 2001.
- BERTOLINI, S. BOM, G.B., CAMPBELL, L.M., FARNIER, M., LANGMAN, MAHLA, G. e cols. Efficacy and safety of atorvastatin compared to pravastatin in patients with hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 130, p. 191-197, 1997.
- BETTERIDGE, D.J. Ciprofibrate – a profile. **Postgrad. Med. J.**, v.69, p.S42-49, 1993.
- BIENVENU, T., REY, E., PONS, G., d'ATHIS, P., OLIVE, G. A simple non-invasive procedure for the investigation of cytochrome P-450IIIa dependent enzymes in human. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, v.29, n.11, p.441-445, 1991.
- BLACK, D.M., BAKKER-ARKEMA, R.G., NAWROCKI, J.W. An overview of the clinical safety profile of atorvastatin (Lipitor), a new HMG-CoA reductase inhibitor. **Arch. Intern. Med.**, v.158, p.577-584, 1998.
- BLUM, C.B. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Am. J. Cardiol.**, v.73, p.3D-11D, 1994.
- BO, M., NICOLELLO, M.T., FIANDRA, U., MERCADANTE, G., PILIEGO, T., FABRIS, F. Treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: atorvastatin vs. simvastatin. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Milan, v.11, n.1, p.17-24, 2001.

- BOKOCH, G.M., PROSANITZ, V. Isoprenoids metabolism is required for stimulation of the respiratory burst oxidase of HL-60 cells. **J. Clin. Invest.**, v.89, p.402-408, 1992.
- BOUSQUET, P., GAYET, J.L. Pharmacologic characteristics of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Therapie.*, v.58, n.2, p.113-121, 2003.
- BOTTORF, M. 'Fire and forget?'- pharmacological considerations in coronary care. **Atherosclerosis**, v.147, n.1, p.S23-S30, 1999a.
- BOTTORF, M.B. Distinct drug-interaction profiles for statins. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v.56, p.1019-1020, 1999b.
- BRACS, P., BEST, J., HAMILTON-CRAIG, I. A one year study comparing atorvastatin and simvastatin in patients with hypercholesterolemia. Paper presented at **66th Congress of the European Atherosclerosis Society**. Florence, Italy. 1996.
- BRORHOLT-PETERSEN, J.U., JENSEN, H.K., RAUNGAARD, B., GREGERSEN, N., FAERGEMAN, O. LDL-receptor gene mutations and the hypocholesterolemic response to statin therapy. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v.59, n.6, p.397-405, 2001.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v.234, p.177-186, 1999.
- BROOKS, B.A., McBRIDE, O.W., DOLPHIN, C.T., FARRALL, M., SCAMBLER, P.J., GONZALEZ, F.J., IDLE, J.R. The gene CYP3 encoding P450pcn1 (nifedipine oxidase) is tightly linked to the gene COL1A2 encoding collagen type 1 alpha on 7q21-q22.1. **Am. J. Hum. Genet.**, v.43, p. 280-284, 1988.
- BROUSSEAU, T., LECERF, J.M., LUC, G., DEVULDER, B., FRUCHART, J.C., AMOUYEL, P. Detection of Arg 3550-Gln mutation of B apolipoprotein. Value in clinical practice. **Presse Med.**, v.24, p.769-772, 1995.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Washington, v.232, p.34-47, 1986.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Receptor mediated control of cholesterol metabolism. **Science**, Washington, v.191, p.150, 1976.

- BURSTEIN, M., SCHOLNICK, H.R., MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human plasma serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid Res.**, New York, v.11, n.6, p.583-595, 1970.
- CASTELLI, W.P. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham Study. **Am. J. Med.**, New York, v.76, suppl.2A, p.4-12, 1984.
- CARSWELL, C.I., PLOSKER, G.L., JARVIS, B. Rosuvastatin. **Drugs**, v.62, p.2075-2085, 2002.
- CARMENA, R., ROEDERER, G., MAILLOUX, H., LUSSIER-CACAN, S., DAVIGNON, J. The response to lovastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia is modulated by apolipoprotein E polymorphism. **Metabolism**, Philadelphia, v.42, p.895-901, 1993.
- CAVALLI, S.A. **Análise da mutação 3500 e dos polimorfismos MspI, XbaI, Ins/Del e 3' HVR do gene da apolipoproteína B-100 em indivíduos caucasianos hipercolesterolêmicos.** São Paulo, 1999. 114p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- CAVALLI, S.A., HIRATA, M.H., HIRATA, R.D.C. Detection of *MbolI* polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. **Clin. Chem.**, v.47, n.2, p. 348-351, 2001.
- CAVALLI, S.A., HIRATA, M.H., HIRATA, R.D.C. Rapid detection of 3500Q and 3531 mutations and MspI polymorphism in exon 26 at the apolipoprotein B gene. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.15, p.35-39, 2001.
- CAVALLI, S.A., HIRATA, M.H., SALAZAR, L.A., DIAMENT, J., GIANNINI, S.D., FORTI, N., NAKANDAKARE, E.R., BERTOLAMI, M.C., HIRATA, R.D. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.302, p.189-203, 2000.
- CHAVES, F.J., REAL, J.T., GARCIA-GARCIA, A.B., CIVERA, M, ARMENGOD, M.E., ASCASO, J.F., CARMENA, R. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v.86, n.10, p.4926-4932, 2001.
- CHEN, L., HAUGHT, W.H., YANG, B. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.30, p.569-575, 1997.

- CHOONG, M.L., SETHI, S.K., KOAY, E.S. Effects of intragenic variability at 3 polymorphic sites of the apo B gene on serum lipids and lipoproteins in a multiethnic asian population. **Hum. Biol.**, Baltimore, v.71, n.3, p.381-397, 1999.
- CHOONG, M.L., SETHI, S.K., KOAY, E.S. The *StuI* polymorphism on exon 8 of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene: prevalence and impact on serum lipid levels in an Asian cohort. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v.27, n.4, p.503-506, 1998.
- CHOWBAY, B. CUMARASWAMY, S., CHEUNG, Y.B., ZHOU, Q., LEE, E.J.D. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant patients. **Pharmacogenetics**, v. 13, p. 89-95, 2003.
- CHRISTIANS, U., JACOBSEN, W., FLOREN, L.C. Metabolism and drug interactions of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? **Pharmacols. Ther.**, v.80, n.1, p.1-34, 1998.
- CILLA, D.D., WHITFIELD, L.R., GIBSON, D.M., SEDMAN, A.J., POSVAR, E.L. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy individuals. **Clin. Pharmacols. Ther.**, v.60, p.687-695, 1996.
- CORSINI, A., BELLOSTA, S., BAETTA, R., FUMAGALLI, R., PAOLETTI, R., BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacols. Ther.**, v.84, n.3, p.413-428, 1999.
- DAI, D., TANG, J., ROSE, R., HODGSON, E., BIENSTOCK, R.J., MOHRENWEISER, H.W., GOLDSTEIN, J.A. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. **J. Pharmacols. Exp. Ther.**, v. 299, p. 825-831, 2001.
- DAVIDSON, M.H. Newer pharmaceutical agents to treat lipid disorders. **Curr. Cardiol. Rep.**, v.5, n.6, p.463-469, 2003.
- DEN DUNNEN, J.T., ANTONARAKIS, S.E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. **Hum. Mutat.**, New York, v.15, p.7-12, 2000.
- DIRETRIZES brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v.77, supl. III, p.4-48, 2001. [III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, Pouso Alegre, MG, 2000].

- DOMANSKI, T.L.; FINTA, C.; HALPERT, J.R.; ZAPHIROPOULOS, P.G. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. **Mol. Pharmacol.**, v.59, p.386-392, 2001.
- DOWNS, J.R., CLEARFIEDL, M., WEIS, S., WHITNEY, E., SHAPIRO, D.R., BEERE, P.A., LANGENDORFER, A., STEIN, E.A., KRUYER, W., GOTTO Jr, A.M. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.279, p. 1615-1622, 1998.
- DUCHARME, M.P., WARBASSE, L.H., EDWARDS, D.J. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.57, p.485-491, 1995.
- EISELT, R. DOMANSKI, T.L., ZIBAT, A., MUELLER, R., PRESECAN-SIEDEL, E. e cols. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. **Pharmacogenetics**, v. 11, p. 447-458, 2001.
- EGROS, F., LANGAN, J., BERTOLINI, S. A one year study comparing atorvastatin and pravastatin in patients with hypercholesterolemia. Paper presented at **66th Congress of the European Atherosclerosis Society**. Florence, Italy. 1996.
- EINARSSON, K., ERICSSON, S., EWERTH, S., REIHNER, E., RUDLING, M., STAHLBER, D., ANGELIN, B. Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.40, suppl.1, p.S53-58, 1991.
- EJARQUE, I., CIVER, M., FRANCISCO ASCASO, J., KNECHT, E., EUGENIA ARMENGOD, M., CARMEN, R., TOMAS REAL, J., FRANCISCO CHAVES, J., JAVIER MARTIN DE LLANO, J. Identification and characterization of the first Spanish familial ligand-defective apolipoprotein B homozygote. **Med. Clin.**, Barcelona, v.116, n.4, p.138-141, 2001.
- EKINDJIAN, O.G., DUCHASSAING, D. Critical study of methods of estimation by an enzymatic method of serum triglycerides. **Ann. Biol. Clin.**, London, v.37, n.3, p.175-180, 1979.
- ELGHANNAM, H., TAVACKOLI, S., FERLIC, L., GOTTO Jr., A.M., BALLANTYNE, C.M., MARIAN, A.J. A prospective study of genetic markers of susceptibility to infection and inflammation, and the severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and its response to therapy. **J. Mol. Med.**, v.78, n.10, p.562-568, 2000.
- ENDO, A., KORUDA, J., TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrium*. **J. Antibiot.**, v.29, p.1376-1378, 1976.

- EVERETT, D.W., CHANDO, T.J., DIDONATO, G.C., SINGHVI, S.M., PAN, H.Y., WEINSTEIN, S.H. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. **Drug Metab. Dispos.**, v.19, p.740-748, 1991.
- FARMER, J.A., GOTTO, A.M. Choosing the right lipid-regulating agent. **Drugs**, v.52, p.649-661, 1996.
- FARNIER, M., DAVIGNON, J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. **Am. J. Cardiol.**, v.82, p.3J-10J, 1998.
- FEHER, M.D., WEBB, J.C., PATEL, D.D. Cholesterol-lowering drug therapy in a patient with receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.103, p.171-180, 1993.
- FINTA, C.; ZAPHIROPOULOS, P.G. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. **Gene**, v.260, p.13-23, 2000.
- FISHER, E., SCHARNAGL, H., HOFFMANN, M.M., KUSTERER, K., WITTMANN, D., WIELAND, H., GROSS, W., MÄRZ, W. Mutations in the apolipoprotein (apo) B-100 receptor-binding region: detection of apo B-100 (Arg 3500→Trp) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (Glu3405→Gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.45, n.7, p.1026-1038, 1999.
- FLORES, N.A. Pitavastatina. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v.3, p.1334-1341, 2002.
- FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., LEES, R.S. Fat transport in lipoproteins – an integrated approach to mechanisms and disorders. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.276, p.32, 1967.
- FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifugation. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.18, p.499-509, 1972.
- FRUCHART, J.C., DURIEZ, P., STAELS, B. Molecular mechanism of action of the fibrates. **J. Soc. Biol.**, v.193, n.1, p.67-75, 1999.
- FU, Y., KATSUYA, T., HIGAKI, J., ASAI, T., FUKUDA, M., TAKIUCHI, S., HATANAKA, Y., RAKUGI, H., OGIHARA, T. A common mutation of low-density lipoprotein receptor gene is associated with essential hypertension among Japanese. **J. Hum. Hypertens.**, London, v.15, p.125-130, 2001.
- GARCIA-MARTIN, E., MARTINEZ, C., PIZARRO, R.M., GARCIA-GAMITO, F.J., GULLSTE, H., RAUNIO, H., AGUNDEZ, J.A. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 71, p. 196-204, 2002.

- GED, C., ROUILLON, J.M., PICHARD, L., COMBALBERT, J., BRESSOT, N., BORIES, P., MICHEL, H., BEAUNE, P., MAUREL, P. The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III α induction. **Br. J. Clin. Pharmacols.**, v.28, p.373-387, 1989.
- GIANNINI, S.D. **Aterosclerose e Dislipidemias**. Clínica e terapêutica: Fundamentos Práticos. BG Cultural Ed., São Paulo, 1998.
- GOH, B.C., LEE, S.C., WANG, L.Z., FAN, L., GUO, J.Y., LAMBA, J. e cols. Explaining interindividual variability fo docetaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in Asians through phenotyping and genotyping strategies. **J. Clin. Oncols.**, v. 20, p. 3683-90, 2002.
- GOODWIN, B., HODGSON, E., LIDDLE, C. The orphan human pregnane X receptor mediates the the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. **Molec. Pharmacols.**, v.56, p.1329-1339, 1999.
- GUDNASON, V., PATEL, D., SUN, X.M., HUMPHRIES, S., SOUTAR, A.K., KNIGHT, B.L. Effect of the *Stu1* polymorphism in the LDL receptor gene (Ala 370 to Thr) on lipid levels in healthy individuals. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v.47, n.2, p.68-74, 1995.
- GUENGERICH, F.P. Cytochrome p-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. **Annu. Rev. Pharmacols. Toxicols.**, v.39, p.1-17, 1999.
- GUENGERICH, F.P. Minireview – Human cytochrome P-450 enzymes **Life Sci.**, v.50, p.1471-1478, 1992.
- GUZMÁN, E.C.R. **Polimorfismo genético da apolipoproteína B em indivíduos com perfil lipídico de alto risco para doenças cardiovasculares**. São Paulo, 1998. 115p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- GUZMÁN, E.C.R., HIRATA, M.H., QUINTÃO, E.C.R., HIRATA, R.D.C. Association of the apolipoprotein B gene polymorphism with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with lipid profile of high risk for coronary heart disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v.38, n.8, p.731-736, 2000.
- HAMELIN, B.A., TURGEON, J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects o HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends Pharmacols. Sci.**, v.19, p.26-37, 1998.

- HAMZEIY, H., VAHDATI-MASHHADIAN, N., EDWARDS, H.J., GOLDFARB, P.S. Mutation analysis of the Human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. **Mutat. Res.**, v. 500, p. 103-10, 2002.
- HASHIMOTO, H., TOIDE, K., KITAMURA, R., FUJITA, M., TAGAWA, S., ITOH, S., KAMATAKI, T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. **Eur. J. Biochem.**, v.218, p.585-595, 1993.
- HEATH, K.E., GUDNASON, V., HUMPHRIES, S.E., SEED, M. The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v.143, p.41-54, 1999.
- HOFFMANN, M.M., WINKELMANN, B.R., WIELAND, H MÄRZ, W. The significance of genetic polymorphisms in modulating the response to lipid-lowering drugs. **Pharmacogenomics**, v.2, n.2, p.107-121, 2001.
- HSIEH, K.P.; LIN, Y.Y.; CHENG, C.L.; LAI, M.L.; LIN, M.S.; SIEST, J.P.; HUANG, J.D. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. **Drug Metab. Dis.**, v.29, n.3, p.268-273, 2001.
- HSU, I., SPINLER, S.A., JOHNSON, N.E. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMG-CoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. **Ann. Pharmacother.**, v.29, p.743-759, 1995.
- HUNT C.M., WATKINS, P.B., SAENGER, P., STAVE, G.M., BARLASCINI, N., WATLINGTON, C.O., WRIGHT, J.T., GUZELIAN, P.S. Heterogeneity of CYP3A isoforms metabolizing erythromycin and cortisol. **Clin. Pharmacols. Ther.**, v.51, p.18-23, 1992.
- IGLESIAS, P., DIEZ, J.J. New drugs for the treatment of hypercholesterolemia. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v.12, n.11, p.1777-1789, 2003.
- ILLINGWORTH, D.R., TOBERT, J.A. A review of clinical trials comparing HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin. Ther.**, v.16, p.366-385, 1994.
- JACOTOT, B., BENGHOZI, R., PFISTER, P. Comparison of fluvastatin versus pravastatin treatment of primary hypercholesterolemia. **Am. J. Cardiol.**, v.76, p.54A-56A, 1995.
- JEU, L., CHENG, J.W. Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH 58235), a cholesterol-absorption inhibitor. **Clin Ther.**, v.25, n.9, p.2352-87, 2003.

- JONES, P.H., DAVIDSON, M.H., STEIN, E.A., BAYS, H.E., MCKENNEY, J.M., MILLER, E., CAIN, V.A., BLASETTO, J.W.; STELLAR STUDY GROUP. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am. J. Cardiol.*, v.92, n.2, p.152-160, 2003.
- JOUNAÏDI, Y., GUZELIAN, P.S., MAUREL, P., VILAREM, M.J. Sequence of the 5'-flanking region of CYP3A5: comparative analysis with CYP3A4 and CYP3A7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.205, n.3, p.1741-1747, 1994.
- KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P., GORDON, T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. *Ann. Int. Med.*, Philadelphia, v.90, p.85-91, 1979.
- KAJINAMI, K., TAKEKOSHI, N., SAITO, Y. Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovasc. Drug Rev.*, v.21, n.3, p.199-215, 2003.
- KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, Philadelphia, v.41, supp.1, p.1, 1970.
- KIMURA, M., KUROSE, I., RUSSELL, J., GRANGER, D.N. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Dallas, v.17, p.11521-11526, 1997.
- KITAZAWA, E., TAMURA, N., IWABUCHI, H., UCHIYAMA, M., MURAMATSU, S., TAKAHAGI, H., TANAKA, M. Biotransformation of pravastatin sodium (I). Mechanism of enzymatic transformation of epimerization of an allylic hydroxy group of pravastatin sodium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.192, p.597-602, 1993.
- KLIEWER, S.A., MOORE, J.T., WADE, L., STAUDINGER, J.L., WATSON, M.A., JONES, S.A. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, v.92, p.73-82, 1998.
- KOTZE, M.J., PEETERS, A.V., LANGENHOVEN, E., WAUTERS, J.G., VAN GAAL, L.F. Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemic. *Atherosclerosis*, Shannon, v.111, p.217-225, 1994.
- KOVACS, S.J., MARTIN, D.E., EVERITT, D.E., PATTERSON, S.D., JORKASKY, D.K. Urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as an in vivo marker for CYP3A induction: applications and recommendations. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.63, p.617-622, 1998.

- KUPFERSCHMIDT, H.H.T., FATTINGER K.E., HA, H.R. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man. **Br. J. Clin. Pharmacols.**, v.45, p.355-359, 1998.
- KUPFERSCHMIDT, H.H.T., HÁ, H.R., ZIEGLER W.H. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. **Clin. Pharmacols. Ther.**, v.58, p.20-28, 1995.
- LACOSTE, L., LARN J.Y.T., HUNG, J. Hyperlipidaemia and coronary disease: correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. **Circulation**, v.92, p.3172-3177, 1995.
- LAMB, R.G., KOCH, J.C., BUSH, S.R. An enzymatic explanation of the differential effects of oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1165, p.299-305, 1993.
- LAMBA, J.K., LIN, Y.S., SCHUETZ, E.G., THUMMEL, K. Genetic contribution to variable human CYP3A4-mediated metabolism. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 54, p.1271-94, 2002a.
- LAMBA, J.K., LIN, Y.S., THUMMEL, K., DALY, A., WATKINS, P.B., STROM, S. ZHANG, J., SCHUETZ, E.G. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different population. **Pharmacogenetics**, v. 12, p. 131-32, 2002b.
- LaROSA, J.C. Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.88, p.291-293, 2001.
- LEE, C. Urinary 6 β -hydroxycortisol in humans: analysis, biological variations, and reference ranges. **Clin. Biochem.**, v.28, n.1, p.49-54, 1995.
- LEHMANN, J.M., MCKEE, D.D., WATSON, M.A., WILSON, T.M., MOORE, J.T., KLIEWER, S.A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.1016-1023, 1998.
- LEHR, H.A., SEEMULLER, J., HUBNER, C. Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium in vivo involves the receptor for platelet activating factor. **Arterioscler. Thromb.**, v.13, p.1013-1018, 1993.
- LENNERNÄS, H., FAGER, G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin. Pharmacokinet.**, v.32, n.5, p.403-425, 1997.
- LIAU, J.K., SHIN, W.S., LEE, W.Y., CLARK, S.L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric synthase. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.319-324, 1995.
-

- LINDER, M.W., PROUGH, R.A., VALDES, J.R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. **Clin. Chem.**, v.43, n.2, p.254-266, 1997.
- LIPID - Long-Term Intervention with pravastatin in ischaemic disease study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 339, p. 1349-1357, 1998.
- LOTUFO, P.A. Non-communicable diseases in Brazil: mortality patterns, morbidity studies and risk factors. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.2, suppl.1, p.25-29, 1997.
- LUDWIG, E.H., FRIEDL, W., MCCARTHY, B.J. High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.45, p.458-464, 1989.
- LUDWIG, E.H., MCCARTHY B.J. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.47, p.712-720, 1990.
- LUTUCUTA, S., BALLANTYNE, C.M., ELGHANNAM, H., GOTTO Jr, 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.
- LYKKESFELDT, J., LOFT, S., POULSEN, H.E. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.**, v.660, n.1, p.23-29, 1994.
- MACHADO, M.O. **Polimorfismo genético da apolipoproteína B em indivíduos com doença cardíaca isquêmica.** São Paulo, 1997. 123p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- MAHLEY, R.W., HUANG, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Curr. Opin. Lipidol.**, v.10, p.207-217, 1999.
- MALINOWSKI, J.M. Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v.55, p.2253-2267, 1998.

- MARIAN, A.J., SAFAVI, F., FERLIC, L., DUNN, J.K., GOTTO, A.M., BALLANTYNE, C.M. Interactions between angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and response of plasma lipids and coronary atherosclerosis to treatment with fluvastatin: the lipoprotein and coronary atherosclerosis study. *J. Am. Cardiol.*, New York, v.35, n.1, p.89-95, 2000.
- MÄRZ, W., BAUMSTARK, M., SCHARNAGL, H. Accumulation of "small dense" low density lipoprotein in a homozygous patient with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogenous interaction of LDL subfraction with the LDLreceptor. *J. Clin. Invest.*, v.92, p.2922-2933, 1993.
- MAYER, J., ELLER, T., BRAUER, P. Effects of long term treatment with lovastatin on the clotting system and blood platelets. *Ann. Hematol.*, v.64, p.196-201, 1992.
- McTAVISH, D., SORKIN, E.M. Pravastatin: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolemia. *Drugs*, v.42, p.65-89, 1992.
- MESSER, C.J., WHALEN, H., STACK, C.B., STEPHENS, J.C., HOFFMANN, M.M., KUMAR, K., NANDABALAN, R.S., JUDSON, R.S., MÄRZ, W., RUANO, G., DRYSDALE, C.M., WINKELMANN, B.R. Haplotypes of the cholesterol ester transfer protein (CETP) are predictors of the response to statins. Abstract Book: **XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism**, p.37, 2001. [XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, New York, NY, september 9-12, 2001].
- MIETTINEN, T., GYLLING, H. ABCG5/8 genes responsible for serum plant sterol increase during statin treatment. Abstract Book: **XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism**, p.37, 2001. [XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, New York, NY, september 9-12, 2001].
- MITCHEL, Y.B. The long-term tolerability profile of lovastatin and simvastatin. *Atherosclerosis*, v.97, p.S33-S39, 1992.
- MOGHADASIAN, M.H. Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.*, v.65, n.13, p.1329-1337, 1999.
- MOORE, R.A., CALLAHAN, M.F., CODY, M., ADAMS, P.L., LITCHFORD, M., BUCKNER, K., GALLOWAY, J. The effect of the American Heart Association step one diet on hyperlipidemia following renal transplantation. *Trasplantation*, v.49, n.1, p.60-62, 1990.

- MURAMATSU, S., MIYAGUCHI, K., IWABUCHI, H., MATSUSHITA, Y., NAKAMURA, T., KINOSHITA, T., TANAKA, M., TAKAHAGI, H. Metabolism of pravastatin sodium in isolated rat hepatocytes. **Xenobiotica**, v.22, p.487-498, 1992.
- MYANT, N.B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, Shannon, v.104, p.1-18, 1993.
- NAWROCKI, J.W., WEISS, S.R., DAVIDSON, M.H., SPRECHER, D.L., SCHWARTZ, S.L., LUPIEN, P.J., JONES, P.H., HABER, H.E., BLACK, D.M. Reduction of LDL-cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin in new HMG-CoA reductase inhibitor. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, p.678-682, 1995.
- NEGRE-AMINOU, P., VAN VLIET, A. K., VAN ERC, M. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1345, p.259-268, 1997.
- NELSON, D.R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J.J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D.J. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v.6, p.1-42, 1996.
- NEUMAIER, M., BRAUN, A., WAGENER, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. **Clin. Chem.**, v.44, n.1, p.12-26, 1998.
- NOTARBARTOLO, A., DAVI, G., AVERNA, M. Inhibitors of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, p.247-251, 1995.
- OJALA, J.P., HELVE, E., EHNHOLM, C., AALTO-SETALA, K., KONTULA, K.K., TIKKANEN, M.J. Effect of apolipoprotein E polymorphism and XbaI polymorphism of apolipoprotein B on response to lovastatin treatment in familial and non-familial hypercholesterolemia. **J. Intern. Med.**, Oxford, v.230, p.397-405, 1991.
- O'MALLEY, J.P., ILLINGWORTH, D.R. The influence of apolipoprotein E phenotype on the response to lovastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Metabolism**, v.39, p.150-154, 1990.

- O'NEILL, F.H., PATEL, D.D., KNIGHT, B.L., NEUWIRTH, C.K.Y., BOURBON, M., SOUTAR, A.K., TAYLOR, G.W., THOMPSON, G.R., NAUMOVA, R.P. Determinants of variable response to statin treatment in patients with refractory Familial Hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.21, p.832-837, 2001.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Familial hypercholesterolemia (FH). **Report of a WHO Consultation**, Paris, October 3, 1997. [WHO/HGN/FH/CON/98.7]. 1998.
- PASTERNAK, R.C., SMITH, Jr. S.C., BAIREY-MERZ, C.N. ACC/AHA/NHLBI Clinical advisory on the use and safety of statins. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.40, n.3, p.567-572, 2002.
- PONGRAPEEPORN, K.U., PINSAWAT, T., LIKIDLILID, A., POLDEE, S., YAMWONG, P., AMORNATTANA, A., ONG-AJYOOOTH, S. Effect of *Aval1* and *Nco1* polymorphism at the low density lipoprotein receptor gene on plasma lipid levels in a group of Thai subjects. **J. Med. Assoc. Thai**, v.83, Supl. 2, p.S74-80, 2000.
- POSVAR, E.L., RADULOVIC, L.L., CILLA, D.D., WHITFIELD, L.R., SEDMANN, A.J. Tolerance and pharmacokinetics of single-dose atorvastatin, a potential inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, v.36, p.728-731, 1996.
- RAAL, F.J., PILCHER, G., RUBINSZTEIN, D.C., LINGENHEL, A., UTERMANN, G. Statin therapy in a kindred with both apolipoprotein B and low density lipoprotein receptor gene defects. **Atherosclerosis**, v.129, p.97-102, 1997.
- REAL, J.T, CHAVES, F.J., CIVERA, M., GARCIA-GARCIA, A.B, ASCASO, J.F., ARMENGOD, M.E., CARMENA, R. Influencia de las mutaciones HF Valencia 1 y 2 del gen del receptor de LDL sobre la respuesta terapéutica a simvastatina en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigota caracterizada molecularmente. **Med. Clin (Barc)**, Barcelona, v.116, p.81-85, 2001.
- REBBECK, T.R., JAFFE, J.M., WALKER, A.H., WEIN, A.J., MALKOWICZ, S.B. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.90, p.1225-1229, 1998.
- RENGES, H.H., WILE, D.B. MCKEIGUE, P.M., MARMOT, M.G., HUMPHRIES, S. E. Apolipoprotein B gene polymorphism are associated with lipid levels in men of south Asian descent. **Atherosclerosis**, Shannon, v.91, p.267-275, 1991.

- RIVORY, L.P., QIN, H., CLARKE, S.J., ERIS, J., DUGGIN, G. RAY, E., TRENT, R.J., BISHOP, J.F. Frequency of cytochrome P450 3^A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, V. 56, p., 395-398, 2000.
- ROGLER, G., LACKNER, K.J., SCHMITZ, G. Effects of fluvastatin on growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro. *Am. J. Cardiol.*, v.76, p.114-116A, 1995.
- SACKS, F.M., PFEFFER, M.A., MOYE, L.A., ROULEAU, J.L., RUTHERFORD, J.D., COLE, T.G., BRWN, L., WARNICA, J.W., ARNOLD, J.M., DAVIS, B.R., BRAUNWAKALD, E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 335, n.14, p. 1001-1009, 1996.
- SAHA, N., TONG, M.C., TAY, J.S.H., JEYASEELAN, K, HUMPHRIES, S.E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. *Clin. Genet.*, v.42, p.164-170, 1992.
- SALAZAR, L.A. **Influência de alterações genéticas do receptor da LDL no perfil lipídico e na resposta terapêutica de indivíduos brasileiros hipercolesterolêmicos.** São Paulo, 2002. 160p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- SALAZAR, L.A. **Polimorfismos *Aval* e *HincII* do gene do receptor da LDL em indivíduos com perfil lipídico de alto risco para as doenças cardiovasculares.** São Paulo, 1998. 106p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., CAVALLI, S.A., MACHADO, M.O, HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin. Chem.*, Winston Salem, v.44, n.8, p.1748-1750, 1998.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., FORTI, N., DIAMENT, J., HIRATA, R.D. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response in Familial Hypercholesterolemia. Abstract Book: **XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism**, p.37, 2001a. [XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, New York, NY, september 9-12, 2001].

- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., GIANNINI, S.D., FORTI, N., DIAMENT, J., LIMA, T.M., HIRATA, R.D. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.300, p.139-149, 2000a.
- SALAZAR LA, HIRATA MH, HIRATA RD. Increasing the sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis of the LDLR gene mutations in brazilian patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Chem Lab Med*, v. 40, p. 441-5, 2002.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., QUINTÃO, E.C., HIRATA, R.D. Polimorfismo Avall do gene do receptor da LDL: um marcador genético útil na avaliação da resposta terapêutica em indivíduos hipercolesterolêmicos. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, Rio de Janeiro, v.31, n.3, p.137-141, 1999.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., QUINTÃO, E.C., HIRATA, R.D.C. Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. *J. Clin. Lab. Anal.*, New York, v.14, p.125-131, 2000b.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3a. ed. 3 vol., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA, 2001.
- SATA, F., SAPONE, A., ELIZONDO, G., STOCKER, P., MILLER, V.P., ZHENG, W., RAUNIO, H., CRESPI, C.L., GONZALEZ, F.J. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.67, n.1, p.48-56, 2000.
- SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, v.344, p.1383-1389, 1994.
- SCHAEFER, E.J., PEDRO-BOTET, J., BROUSSEAU, M., ORDOVAS, J.M. Genetic factors related to LDL lowering response to statins. Abstract Book: **XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism**, p.36, 2001. [XIV International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, New York, NY, september 9-12, 2001].
-

- X SCHUETZ, J.D., BEACH, D.L., GUZELIAN P.S. P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. **Pharmacogenetics**, v.4, p.11-20, 1994.
- SCHULTE, K-L., BEIL, S. Efficacy and tolerability of fluvastatin and simvastatin in hypercholesterolemic patients: a double-blind, randomized, parallel-group comparison. **Clin. Drug Invest.**, v.12, 119-126, 1996.
- SHEPHERD, J. Mechanism of action of bile acid sequestrants and other lipid lowering drugs. **Cardiology**, v.76, suppl.1, p.65-71, 1989.
- SHEPHERD, J., COBBE, S.M., FORD, I., ISLES, C.G., LORIMER, A.R., MacFARLANE, P.W., McKILLOP, J.H., PACKARD, C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 333, n.20, p. 1301-1307, 1995.
- SHIMADA, T., YAMAZAKI, H., MIMURA, M., INUI, Y., GUENGERICH, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.270, n.1, p.414-423, 1994.
- SIMONS, L.D. Interrelations of lipid lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.27, p.50-106, 1986.
- SPURR, N.K., GOUGH, A.C., STEVENSON, K., WOLF, C.R. The human cytochrome P450 CYP3 locus: assignment to chromosome 7q22.qter. **Hum. Genet.**, v.81, p.171-174, 1989.
- STAELS, B., AUWERX, J. Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. **Atherosclerosis**, v.137, suppl.S19-23, 1998.
- STAMLER, J., WENTWORTH, D., NEATON, J.D. Is relationship between cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.256, p.2823-2828, 1986.
- STEIN, E., SPRECHER, D., ALLEMBY, K.S., TOSIELLO, R.E., WHALEN, E., RIPA, S.R. Cerivastatin, a new potent synthetic HMG CoA reductase inhibitor: effect of 0.2 mg daily in subjects with primary hypercholesterolemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.**, Philadelphia, v.2, n.1, p.7-16, 1997.
- STRACHAN, T., READ, A.P. Mutation and instability of human DNA. In: **Human Molecular Genetics**. Wiley-Liss, New York, 1996. cap. 10, p.241-273.

- SUN, X.M., PATEL, D.D., KNIGHT, B.L., SOUTAR, A.K., The Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Limerick, v.136, p.175-185, 1998.
- TAI, D.Y., PAN, J.P., LEE-CHEN, G.J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg₃₅₀₀→Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. **Clin. Chem.**, Winston Salem, v.44, n.8, p.1659-1665, 1998.
- THOMPSON, P.D. What's new in lipid management? **Pharmacotherapy**, v.23, n.9 (Pt2), p. 34S-40S, 2003.
- TRAN, J.Q., KOVACS, S.J., MCINTOSH, T.S., DAVIS, H.M., MARTIN, D.E. Morning spot and 24-hour urinary 6 β -hydroxycortisol to cortisol ratios: intraindividual variability and correlations under basal conditions and conditions of CYP3A4 induction. **J. Clin. Pharm.**, v.39, p.487-494, 1999.
- TURBAN, S., FUENTES, F., FERLIC, L., BRUGADA, R., GOTTO, A.M, BALLANTYNE, CM., MARIAN, A.J. A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. **Atherosclerosis**, Limerick, v.154, v.3, p.633-640, 2001.
- VAN SCHAİK, R.H.N., DE WILDT, N., VAN IPEREN, N.M., UITTERLINDER, A.G., VAN DEN ANKER, J.N., LINDEMANS, J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 dutch Caucasians. **Clin. Chem.**, v.46, n.11, p.1834-1836, 2000.
- VAN SCHAİK, R.H.N., DE WILDT, S.N., BROSENS, R., VAN FESSEM, M., VAN DEN ANKER, J.N., LINDEMANS, J. The CYP3A4*3 allele: is it really rare? **Clin. Chem.**, v. 47, p.114-6, 2001.
- VAUGHAN, C.J., MURPHY, M.B., BUCKLEY, B.M. Statins do more than just lower cholesterol. **Lancet**, London, v.348, p.1079-1082, 1996.
- VAUGHAN, C.J.; GOTTO, A.M.; BASSON, C.T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.35, n.1, p.1-10, 2000.
- WAGNER, B., HUWEL, D., REHORST, D. One year treat-to-target study of atorvastatin versus pravastatin in high risk-stratified hypercholesterolemic patients. Paper presented at 66th Congress of the European Atherosclerosis Society. Florence, Italy. 1996.

- WALKER, M.R., RAPLEY, R. Tipos de mutações e seus efeitos. In: **Guia de Rotas na Tecnologia do Gene**. Atheneu Ed., São Paulo, 1999. cap. 16, p.46-47.
- WANDEL, C., WITTE, J.S., HALL, J.M., STEIN, C.M., WOOD, A.J.J., WILKINSON, G.R. CYP3A4 activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B 5'-promoter region polymorphism. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.68, p.82-91, 2000.
- WANG, Z., MOULT, J. SNPs, protein structure, and disease. **Hum. Mut.**, New York, v.17, p.263-270, 2001.
- WENHAM, P.R., HENDERSON, B.G., PENNEY, M.D., ASHBY, J.P., RAE, P.W.H., WALKER, S.W. Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: detection, biochemical features and haplotype analysis of the R3531C mutation in the UK. **Atherosclerosis**, Shannon, v.129, p.185-192, 1997.
- WESTLIND, A., LÖFBERG, L., TINDBERG, N., ANDERSSON, T.B., INGELMAN-SUNDBERG, M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.259, p.201-205, 1999.
- WILLIAMS, R.R., HUNT, S.C., SCHUMACHER, M.C., HEGELE, R.A., LEPPERT, M.F., LUDWIG, E.H., HOPKINS, P.N. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.72, p.171-176, 1993.
- WISEMAN, S.A., POWELL, J.T., HUMPHRIES, S.E., PRESS, M. The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v.77, n.1, p.108-112, 1993.
- WRIGHTON, S.A., STEVENS, J.C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. **Critic. Rev. Toxicol.**, v.22, n.1, p.1-21, 1992.
- WU, J.H., HSIEH, R.P., CHERN, M.S., WEN, M.S., TSENG, C.H. Association of 1617 C→T genetic variation in exon 11 of human low-density lipoprotein receptor and plasma lipid concentration. **Atherosclerosis**, Limerick, v.143, p.217-218, 1999.
- ZAMBON, A., DEEB, S.S., BROWN, B.G., HOKANSON, J.E., BRUNZELL, J.D. Common hepatic lipase gene promoter variant determines clinical

response to intensive lipid-lowering treatment. **Circulation**, Philadelphia, v.103, n.6, p.792-798, 2001.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Características biodemográficas e concentrações séricas de lípidos dos indivíduos com hipercolesterolemia primária (n=88)

Nº	Identificação	Idade	Sexo	Cor	CT	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
1	H1	55	M	B	295	221	40	211	44
2	H2	82	F	N	299	110	76	201	22
3	H3	59	F	N	287	122	65	198	24
4	H4	51	M	B	360	172	48	278	34
5	H5	76	F	N	286	268	47	185	54
6	H6	52	F	B	277	185	38	202	37
7	H7	70	M	B	244	123	45	174	25
8	H8	69	M	N	285	93	72	194	19
9	H9	62	F	B	242	96	54	169	19
10	H10	42	M	B	220	105	30	169	21
11	H11	65	M	N	347	178	49	262	36
12	H12	49	M	B	264	254	39	175	51
13	H13	66	M	B	239	184	38	164	37
14	H14	63	M	B	254	86	80	157	17
15	H15	73	F	B	261	138	48	185	28
16	H16	56	M	B	256	219	36	176	44
17	H17	65	F	B	240	116	51	166	23
18	H18	67	F	B	305	302	38	207	60
19	H19	63	M	B	239	146	46	164	29
20	H20	61	F	B	317	137	58	232	27
21	H21	58	F	B	266	265	47	166	53
22	H22	74	F	B	266	211	53	171	42
23	H23	62	M	B	284	365	34	177	73
24	H24	76	F	N	370	214	54	276	43
25	H25	60	F	N	264	174	51	178	35
26	H26	55	F	N	316	159	53	231	32
27	H27	72	F	B	417	236	44	326	47
28	H28	62	F	B	306	131	66	214	26
29	H29	58	M	B	344	262	39	253	52
30	H30	72	F	B	262	115	53	186	23
31	H31	43	M	B	297	379	39	182	76
32	H32	54	M	B	298	154	45	222	31
33	H33	51	F	N	367	112	73	272	22
34	H34	48	F	N	265	110	56	187	22
35	H35	62	F	B	282	166	80	175	33
36	H36	69	M	B	299	157	51	217	31
37	H37	ND	F	N	300	147	50	221	29
38	H38	68	F	B	287	92	95	174	18
39	H39	73	M	B	360	246	41	270	49
40	H40	53	F	B	292	113	85	184	23
41	H41	64	F	B	275	213	69	163	43
42	H42	56	F	B	295	109	56	217	22

CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, cor branca; A, cor amarela; N, cor negra, ND, não disponível.

Nº	Identificação	Idade	Sexo	Cor	CT	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
43	H43	71	F	B	311	165	70	208	33
44	H44	58	F	B	279	316	44	172	63
45	H45	36	F	N	249	98	59	170	20
46	H46	55	F	B	234	192	35	161	38
47	H47	75	F	N	364	80	79	269	16
48	H48	73	M	B	246	80	63	167	16
49	H49	55	M	B	255	159	42	181	32
50	H50	59	F	N	315	113	68	224	23
51	H51	79	F	B	314	233	66	201	47
52	H52	79	F	B	239	160	41	166	32
53	H53	44	M	B	264	91	47	199	18
54	H54	54	F	N	313	177	53	225	35
55	H55	63	F	N	238	159	33	173	32
56	H56	46	F	B	252	221	46	162	44
57	H57	63	F	N	276	95	51	206	19
58	H58	50	F	B	350	238	41	261	48
59	H59	73	F	B	269	138	51	190	28
60	H60	72	F	B	273	107	62	190	21
61	H61	72	F	B	353	201	44	269	40
62	H62	63	F	N	282	138	59	195	28
63	H63	73	F	N	317	108	88	207	22
64	H64	72	M	B	226	124	54	147	25
65	H65	65	F	B	233	141	46	159	28
66	H66	65	F	N	279	245	36	194	49
67	H67	46	M	B	264	97	59	186	19
68	H68	68	M	B	229	116	59	147	23
69	H69	67	F	B	338	234	65	226	47
70	H70	66	F	B	325	299	44	221	60
71	H71	64	F	B	237	138	57	152	28
72	H72	63	M	B	246	356	28	147	71
73	H73	65	F	N	234	113	56	155	23
74	H74	55	M	B	211	131	42	143	26
75	H75	59	F	N	292	102	95	117	20
76	H76	56	F	B	232	147	48	155	29
77	H77	48	F	B	280	186	43	200	37
78	H78	59	F	B	318	132	72	220	26
79	H79	51	F	B	289	132	84	179	26
80	H80	63	F	N	269	163	47	189	33
81	H81	73	M	B	233	175	38	160	35
82	H82	74	F	B	372	177	27	310	35
83	H83	56	F	B	301	176	60	206	35
84	H84	74	M	N	339	366	54	212	73
85	H85	65	F	N	269	131	45	198	26
86	H86	47	M	B	256	327	31	160	65
87	H87	50	F	B	271	85	72	182	17
88	H88	66	F	B	247	169	46	167	34

CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, cor branca; A, cor amarela; N, cor negra.

Anexo 2 - Características biodemográficas e concentrações séricas de lípidos dos indivíduos com Hipercolesterolemia Familiar (n=32)

Nº	Identificação	Idade	Sexo	Cor	CT	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
1	HF1	50	M	B	417	209	28	347	42
2	HF2	71	F	B	360	88	30	312	18
3	HF3	62	F	B	422	100	38	364	20
4	HF4	61	F	B	386	127	42	319	25
5	HF5	67	M	B	332	125	43	264	25
5	HF6	75	F	B	292	120	36	232	24
7	HF7	55	F	B	418	134	49	342	27
8	HF8	19	F	B	433	67	40	380	13
9	HF9	43	F	B	378	117	44	311	23
10	HF10	73	F	B	295	116	50	222	23
11	HF11	61	F	B	362	195	33	290	39
12	HF12	84	F	B	332	127	32	275	25
13	HF13	60	F	B	292	63	55	224	13
14	HF14	62	F	B	384	176	46	303	35
15	HF15	49	M	B	396	156	38	327	31
16	HF16	47	F	B	440	127	27	388	25
17	HF17	49	F	B	414	109	53	339	22
18	HF18	62	F	B	318	184	24	257	37
19	HF19	65	F	B	308	112	43	243	22
20	HF20	63	F	B	320	197	62	219	39
21	HF21	64	F	B	440	200	46	354	40
22	HF22	52	M	B	425	123	48	352	25
23	HF23	34	M	B	362	172	36	292	34
24	HF24	33	F	B	414	199	55	319	40
25	HF25	32	M	B	285	96	48	218	19
26	HF26	75	F	N	353	75	99	239	15
27	HF27	18	M	B	517	118	21	472	24
28	HF28	19	M	B	419	86	29	373	17
29	HF29	81	F	B	331	131	62	243	26
30	HF30	46	F	B	301	128	54	221	26
31	HF31	51	F	B	298	128	38	234	26
32	HF32	58	F	B	308	112	43	243	22

CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, cor branca; A, cor amarela; N, cor negra.

Anexo 3 - Características biodemográficas e concentrações séricas de lípides dos indivíduos do grupo controle (n=90)

N ^a	Identificação	Idade	Sexo	Cor	CT	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
1	C1	30	M	B	183	95	39	125	19
2	C2	34	F	B	193	51	47	136	10
3	C3	37	F	B	189	101	46	123	20
4	C4	54	F	B	192	110	63	107	22
5	C5	30	F	B	179	51	68	101	10
6	C6	31	F	B	153	74	59	79	15
7	C7	32	M	B	173	50	53	110	10
8	C8	33	M	B	178	53	59	108	11
9	C9	33	M	B	182	53	53	118	11
10	C10	34	F	B	173	50	43	120	10
11	C11	35	F	B	168	92	52	98	18
12	C12	35	F	B	181	54	63	107	11
13	C13	35	M	B	203	132	46	131	26
14	C14	37	F	B	134	56	45	78	11
15	C15	39	F	B	170	59	37	121	12
16	C16	40	F	B	171	57	52	108	11
17	C17	57	M	B	201	38	61	132	8
18	C18	43	M	B	194	62	49	133	12
19	C19	43	M	B	185	63	51	121	13
20	C20	43	M	B	196	131	40	130	26
21	C21	44	F	B	176	88	50	108	18
22	C22	44	M	B	171	69	39	118	14
23	C23	45	F	B	155	56	65	79	11
24	C24	45	F	B	191	98	39	132	20
25	C25	56	M	B	166	115	42	111	23
26	C26	60	M	B	175	86	44	114	17
27	C27	36	F	B	193	148	51	112	30
28	C28	36	M	B	156	101	36	100	20
29	C29	30	M	B	181	128	36	119	26
30	C30	33	F	B	110	63	43	54	13
31	C31	33	M	B	163	84	37	109	17
32	C32	34	M	B	174	57	49	114	11
33	C33	35	M	B	163	81	35	112	16
34	C34	36	F	B	190	93	42	129	19
35	C35	36	F	B	131	81	35	80	16
36	C36	36	F	B	165	44	63	93	9
37	C37	35	M	B	171	99	45	106	20
38	C38	36	M	B	183	72	52	117	14
39	C39	37	F	B	184	49	38	136	10
40	C40	38	M	B	187	114	30	134	23
41	C41	38	M	B	201	80	57	128	16
42	C42	39	F	B	167	77	52	100	15
43	C43	39	F	B	166	75	50	101	15
44	C44	40	F	B	150	81	41	93	16
45	C45	42	F	B	172	42	61	103	8
46	C46	46	M	B	194	80	47	131	16

CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, cor branca; A, cor amarela; N, cor negra.

Nº	Identificação	Idade	Sexo	Cor	CT	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
47	C47	49	M	B	168	126	33	110	25
48	C48	32	F	B	165	86	53	95	17
49	C49	47	M	B	136	46	42	85	9
50	C50	46	M	B	188	120	30	134	24
51	C51	43	F	B	162	79	50	96	16
52	C52	41	F	B	173	51	39	124	10
53	C53	42	F	B	203	122	41	138	24
54	C54	46	F	B	202	94	63	120	19
55	C55	49	F	B	197	132	77	94	26
56	C56	43	F	B	151	62	71	68	12
57	C57	42	F	B	190	61	74	104	12
58	C58	42	F	B	173	48	59	104	10
59	C59	42	F	B	193	51	52	131	10
60	C60	52	F	B	184	59	71	101	12
61	C61	48	F	B	202	110	46	134	22
62	C62	46	F	B	201	192	38	125	38
63	C63	46	F	B	194	137	59	108	27
64	C64	45	F	B	193	77	60	118	15
65	C65	44	F	B	142	68	75	53	14
66	C66	52	F	B	197	103	74	102	21
67	C67	54	F	B	207	63	76	118	13
68	C68	49	F	B	202	81	78	108	16
69	C69	49	F	B	201	131	44	130	26
70	C70	55	F	B	163	199	52	71	40
71	C71	54	F	B	192	119	43	125	24
72	C72	55	F	B	153	100	50	83	20
73	C73	61	F	B	170	100	60	90	20
74	C74	55	F	B	141	107	48	72	21
75	C75	41	F	B	207	124	57	125	25
76	C76	42	F	B	208	84	49	142	17
77	C77	46	F	B	203	104	53	129	21
78	C78	57	F	B	201	87	66	118	17
79	C79	52	F	B	209	105	49	139	21
80	C80	49	F	B	207	70	57	136	14
81	C81	30	M	B	199	82	56	127	16
82	C82	59	M	B	204	73	46	143	15
83	C83	34	M	B	176	174	39	102	35
84	C84	36	M	B	185	132	45	114	26
85	C85	33	M	B	133	48	46	77	10
86	C86	64	M	B	174	105	46	107	21
87	C87	61	M	B	150	92	43	89	18
88	C88	41	M	B	120	114	35	62	23
89	C89	56	M	B	173	54	41	121	11
90	C90	42	M	B	188	164	64	91	33

CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, cor branca; A, cor amarela; N, cor negra.

Anexo 4: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente Nº _____ Iniciais do Paciente _____

Análise das alterações no gene da enzima CYP3A4 do citocromo P450 que influenciam a resposta terapêutica as estatinas em indivíduos hipercolesterolêmicos

Proposta do estudo

A proposta deste estudo clínico é associar alterações presentes no DNA com as variações do perfil lipídico em pacientes com hipercolesterolemia, com o objetivo de estudar marcadores genéticos que possam prevenir o risco de desenvolvimento de aterosclerose ou doença arterial coronariana.

Procedimentos a serem seguidos

Durante o estudo, você visitará seu médico quatro vezes, em um intervalo de 12 semanas. Durante este período, exames físicos serão realizados, bem como colhida à história clínica do paciente.

Amostras de sangue para testes laboratoriais serão colhidas nas 4 consultas no decorrer do estudo. Além disso, você deverá responder um questionário específico, quando solicitado.

Duração do estudo e número de pacientes

Se você aceitar participar deste estudo, sua participação será por três mês. Além de você, cento e quarenta e nove outros pacientes também participarão do estudo.

Benefícios aos participantes

Você receberá todos os testes de laboratório e o tratamento médico sem qualquer custo.

Garantia de Informação

Você, seu parente ou responsável legal tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre sua doença, medicação, procedimentos, riscos e benefícios ou outro aspecto qualquer com relação ao estudo ou sobre seus direitos como paciente. Se ocorrer lesão ou doença relacionada com a investigação, ou dúvidas sobre seus direitos, você deve contatar seu médico, Dr. _____
telefone: _____ durante as horas de trabalho, ou
telefone: _____ após o trabalho.

Participação voluntária e desistência

Sua participação neste estudo é voluntária. Da mesma forma, se você decidir participar do estudo você poderá retirar-se a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico futuro não será afetado.

Confidencialidade dos dados

Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros a menos que sua autorização previa seja obtida.

Gastos adicionais

Você não pagará por qualquer medicação administrada ou testes de laboratório relacionados com a investigação. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo eu, _____
certifico que o Dr. _____ respondeu a todas as minhas
perguntas sobre o estudo e minha condição, e eu voluntariamente aceito participar
dele. Está entendido que eu posso retirar-me do estudo a qualquer momento, e isto
não afetará meus cuidados médicos no presente e no futuro. Todas as informações
a meu respeito serão confidenciais.

Assinatura do paciente/representante legal

Local e data

Assinatura do médico

Local e data

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