

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

**Estudo de polimorfismos genéticos da família ABC:
efeitos na expressão gênica e na resposta farmacológica
a atorvastatina**

Ivanise Marina Moretti Rebecchi

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora:

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

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010402

Ficha Catalográfica

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

Rebecchi, Ivanise Marina Moretti
R289e Estudo de polimorfismos genéticos da família ABC:
efeitos na expressão gênica e na resposta farmacológica
a atorvastatina / Ivanise Marina Moretti Rebecchi. -- São
Paulo, 2004.
98p.

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

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

I. Farmacogenética I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez
Crespo, orientador.

615.766 CDD

Ivanise Marina Moretti Rebecchi

Estudo de polimorfismos genéticos da família ABC: efeitos na expressão gênica e na resposta farmacológica a atorvastatina

**Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientador/presidente**

**Profa. Dra. Tania Cristina Piton Curi
1ª. Examinadora**

**Profa. Dra. Edna Nakandakare
2ª. Examinador**

**Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
3ª. Examinador**

**Prof. Tit. Rui Curi
4ª. Examinador**

São Paulo, 27 de setembro de 2004.



Evoluir é o tentar se reescrever a cada nova experiência

Dedico este trabalho...

À Deus,

Por me conceder paciência e humildade para poder seguir esta jornada.

Ao meu amado filho **Rafael,**

Que apesar de ainda estar na infância mostrou sabedoria ao compreender a minha ausência em muitos momentos!

Aos meus queridos pais, **Francisco e Virma,**

Pelo incentivo, amizade, companheirismo, amor que só mesmo os pais sabem doar!

À minha irmã **Ilaine,**

Pela amizade e incentivo sempre presentes!

À minha querida Orientadora, **Rosario Dominguez Crespo Hirata,**

Pela dedicação, entusiasmo, confiança depositados.

Meus eternos obrigado, respeito e admiração!

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Diretor, Prof. Tit. Therezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Prof. Tit. Ana Campa, pela oportunidade de cumprir uma importante etapa na minha carreira acadêmica.

À Profa. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Coodenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em nome do Dr. Marcelo Chiara Bertolami, Dr. André Arpad Faud, Dr. Daniel Branco Araújo e da Farmacêutica Yara Nakamura pela oportunidade de desenvolvimento da parte clínica desse projeto.

Ao Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela realização dos exames laboratoriais dos pacientes estudados.

Aos pacientes que de forma anônima contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e melhor compreensão da resposta terapêutica a atorvastatina. Muito obrigado.

Ao estatístico Helymar C. Machado pela paciência e compreensão pelas inúmeras vezes que repetiu as análises estatísticas.

Agradecimentos Especiais

À Indústria Pfizer, em nome do Dr. André Yamada, pela doação do medicamento para o desenvolvimento deste projeto.

À Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos – CELM, em nome de sua Presidente, Sra. Elizabeth de Azevedo Marques, pelo apoio econômico para a participação no 37º Congresso da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, realizado no Rio de Janeiro (2003).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Agradecimentos Pessoais

"O desenvolvimento de um projeto requer muita dedicação e persistência, porém sem o incentivo e apoio de outras pessoas essa tarefa seria impossível. Meus sinceros agradecimentos a todos amigos que com uma palavra de apoio ou uma ação serviram de reforço para a continuidade dessa jornada."

À minha querida Profa. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pela oportunidade que me concedeu, pela paciência, apoio e perseverança em acreditar no meu desenvolvimento acadêmico, muito obrigada.

Ao Prof. Mário Hiroyuki Hirata, pelo apoio, pelas sugestões, incentivo e confiança depositados.

À minha querida amiga Dra. Selma Andrea Cavalli, pelo carinho, companheirismo, incentivo e apoio incondicional ao desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

Aos meus queridos companheiros de trabalho, Alice Cristina Rodrigues, Sarah Aparecida Soares, Leonardo de Oliveira Matsumoto e Mustafa Hasan Issa, meu muitíssimo obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Adriana N. Ozaki, Hamilton M. Hinuy, Elizabeth C. Rodriguez Gúzman, Luis A. Salazar Navarrete, Marcos de O. Machado, Bety Chen, Sun Ok Yoon, Rosilene Fressati Cardoso, Carlos Eduardo de Melo, Érika Miguel de Souza, Paulo Henrique P. Carbone, Evelyn Anzai, Simone Cohen Sorkin, Helluih A. Abdallah, Silvério T. dos Santos, Patrícia Barco, Vladimir Tavares, Fabiana Cristina Pereira, Francisco José Forestiero, Leticia Cecon, Marília Reis Gonçalves, André D. Luchessi, Raffaella Picciotti.

Aos Amigos do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em especial às Farmacêuticas Silvia Cardoso e Ligia Maria Giongo Fidelli, pela amizade, incentivo e apoio logístico nos momentos mais críticos, muito obrigada.

Às funcionárias da Secretária do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora Lima.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, Cláudia Luciano dos Reis, Maria Dorlei Moura, Mariano Augusto Antunes Filho, pela amizade e carinho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midori Ychico, Jorge Alves Lima, pelo apoio profissional.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	02
Resumo	03
Abstract	04
1. INTRODUÇÃO	05
1.1. Doença Arterial Coronariana e fatores de risco cardiovascular	05
1.2. Tratamento da hipercolesterolemia	07
1.3. Fatores que influenciam a resposta farmacológica	11
1.4. Genes envolvidos na resposta terapêutica	15
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Casuística.....	22
3.2. Amostras biológicas	24
3.3. Métodos	25
3.3.1. Determinações bioquímicas e hormonais	25
3.3.2. Extração e avaliação do DNA genômico	26
3.3.3. Análise dos polimorfismos genéticos	27
3.3.4. Extração e avaliação do RNA total	32
3.3.5. Ensaio de RT-PCR	34
3.3.6. Medida semi-quantitativa da expressão gênica	36
3.3.7. Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP e RT-PCR	36
3.4. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Análise dos Pacientes estudados	38
4.2. Análise dos polimorfismos genéticos	40
4.3. Efeito dos polimorfismos genéticos sobre o perfil lipídico basal	44
4.4. Efeito dos polimorfismos genéticos após o tratamento	49
4.5. Efeito dos polimorfismos genéticos sobre a expressão gênica	54
4.6. Efeito da atorvastatina sobre a expressão gênica.....	58
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS	84

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AFCAPS/TexCAPS	<i>Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study</i>
ALT	alanina aminotransferase
Apo	apolipoproteína
Apo A-I	Apoliproteína A-I
Apo A-IV	Apoliporoteína A-IV
Apo B	Apoliporpteína B
Apo E	Apoliproteína E
AST	aspartato amino transferase
bp	Pares de base
C	Citosina
CARE	<i>The Cholesterol and Recurrent Events Study</i>
cDNA	Ácido Desoxi-ribonucléico complementar
CETP	proteína de transferência do colesterol esterificado
CK	Creatina quinase
CT	Colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DCV	doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxi-ribonucléico
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Estudo 4S	<i>Scandinavian Simvastatin Survival Study</i>
G	Guanina
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IMC	Índice de massa corpórea
Kb	kilobase
kDa	Kilodalton
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LIPID	<i>Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease</i>
PA	Pressão arterial
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
RLDL	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
T	timina
TE	Tris-EDTA
TG	Triacilgliceróis
V	Volts
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade
WOSCOPS	<i>West of Scotland Coronary Prevention Study</i>

RESUMO

As proteínas da ABC são uma família de transportadores de membrana que participam no transporte de lipídeos e na biodisponibilidade de drogas. Alterações em genes dessas proteínas também têm sido associadas a diferenças na resposta a vários fármacos. Neste estudo, foram avaliados os efeitos dos polimorfismos dos genes *MDR1* (C3435T e G2677T/A) e *MRP1* (G2012T) na expressão de RNAm e concentrações séricas dos lipídeos, em 76 indivíduos com hipercolesterolemia primária, tratados com atorvastatina (10mg/dia/4sem). DNA e RNA foram obtidos a partir de células mononucleares do sangue periférico. Os polimorfismos genéticos foram analisados por PCR-RFLP e a expressão de RNAm foi quantificada por RT-PCR. A distribuição dos genótipos do polimorfismo *MDR1* G2677T/A foi diferente entre brancos e negros ($\chi^2=17,1$; $p=0,002$), sendo a frequência do genótipo GT maior nos brancos (50%) que nos negros (27%). As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *MDR1* C3435T e *MRP1* G2012T foram similares entre brancos e negros. O alelo 3435T foi associado com menor expressão basal do RNAm do gene *MDR1*, em brancos, e com maior concentração basal de Apo AI sérica, em negros. Os polimorfismos G2677T/A do gene *MDR1* e G2012T do gene *MRP1* não parecem associados a variações do perfil lipídico sérico, antes e após o tratamento com atorvastatina. A atorvastatina modificou a expressão de RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1* dependentemente da expressão basal. A redução da expressão do RNAm do gene *MDR1* foi associada com menor resposta de apo B sérica a atorvastatina. Com base nesses resultados, o polimorfismo C3435T parece estar associado com a expressão basal do gene *MDR1* e com a variabilidade na resposta a atorvastatina.

ABSTRACT

The human ABC proteins are a family of membrane translocators that are involved in lipid transport and drug disposition. Genetic polymorphisms in genes encoding these ABC transporters have been associated with differences in response to several drugs. In this study, effects of *MDR1* (C3435T e G2677T/A) and *MRP1* (G2012T) polymorphisms on mRNA expression and serum levels of lipids were evaluated in 76 individual with primary hypercholesterolemia, before and after atorvastatin therapy (10mg/day/4weeks). DNA and RNA were obtained from mononuclear peripheral cells. Polymorphisms were identified by PCR-FFLP and the mRNA expression was quantified by RT-PCR. Genotype distribution of *MDR1* G2677T/A polymorphism was different between whites and blacks ($\chi^2=17,1$; $p=0,002$). The genotype GT frequency was higher in whites (50%) than in blacks (27%). The allelic and genotypic frequencies for *MDR1* C3435T e *MRP1* G2012T polymorphisms were similar between blacks and whites. The 3435T allele was associated with lower basal mRNA expression of the *MDR1* gene in whites, and with higher basal of serum apo AI in blacks. The *MDR1* G2677T/A and G2012T *MRP1* gene polymorphisms do not seem associated with serum lipids variations before and after atorvastatin treatment. RNAm expression of the *MDR1* and *MRP1* genes was modified by atorvastatin in relation to the basal expression. Reduction of RNAm expression of *MDR1* gene was associated with lower response of serum apo B to atorvastatin. In conclusion, C3435T polymorphism is likely to be associated with basal expression of *MDR1* gene and variability in response to atorvastatin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Arterial Coronariana e fatores de risco cardiovascular:

As doenças cardiovasculares (DCV) são doenças degenerativas que compreendem as doenças isquêmicas do coração, como a doença arterial coronariana (DAC), as doenças cerebrovasculares e outras doenças do aparelho circulatório (<http://www.datasus.gov.br>).

As DCV representam uma das principais causas da mortalidade mundial. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, as DCV foram responsáveis, na população mundial, por 14,7 milhões de óbitos em 1990 e 17 milhões de óbitos em 1999 (Bonow *et al.*, 2002). Segundo dados do DATASUS, a mortalidade proporcional por doenças do aparelho circulatório, no Brasil, foi de 32,27%, no ano de 1999 (<http://www.datasus.gov.br>). A taxa de mortalidade por doenças do aparelho circulatório no Brasil, em 1999, foi de 156,9/100.000 habitantes, sendo que a taxa de mortalidade por doença isquêmica do coração, no mesmo período, foi de 46,8/100.000 habitantes. As maiores taxas de mortalidade se concentram nas regiões sul e sudeste do país (<http://www.datasus.gov.br>).

A principal causa de DAC é a aterosclerose, doença progressiva dos vasos sanguíneos caracterizada por espessamento da camada íntima das artérias grandes e médias, que reduz o fluxo sanguíneo e o aporte de oxigênio e nutrientes ao músculo cardíaco (Ross, 1986). O espessamento ocorre devido à proliferação de células musculares lisas e depósito de lipídeos que são fagocitados por macrófagos (*foam cells*) formando placas visíveis (placas de ateroma) na região sub-endotelial das artérias (Llorente e Badimon, 1998). O processo de evolução das placas até a trombose se caracteriza no evento mais importante da DAC. Esse processo depende mais da composição da placa do que do grau de estenose arterial por ela produzido (Llorente e Badimon, 1998).

No processo de formação da placa, a lesão não desnudante ao endotélio é um dos eventos iniciais e é consequência de alteração da homeostase do colesterol, da presença de endotoxinas bacterianas, viroses, compostos químicos do cigarro, deposição de complexos imunes, hipertensão sistêmica, entre outros

fatores. A lesão leva a perda da permeabilidade seletiva e das funções anti-trombogênicas das células endoteliais com aderência de plaquetas e infiltrado de células inflamatórias e lipoproteínas plasmáticas na parede do vaso. Esse infiltrado celular produz fatores de crescimento, os quais promovem a proliferação de células musculares lisas (Ross, 1999).

Foi demonstrado que tanto o colesterol éster quanto o colesterol livre se acumulam nas lesões ateroscleróticas (Simons, 1986; Kannel *et al.*, 1979; Stamler *et al.*, 1986). E em 1999, foi sugerido por Batetta *et al.*, que a esterificação intracelular do colesterol, com seu subsequente acúmulo estimularia a divisão e proliferação de células musculares lisas reforçando, assim, a teoria de que o acúmulo de colesterol intracelular deve estar diretamente correlacionado com o processo aterogênico (Batetta, *et al.*, 1999; Batetta *et al.*, 2003).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento da DAC são as doenças crônico-degenerativas, como as dislipidemias, a hipertensão arterial, o diabetes, a resistência a insulina, a obesidade, as doenças trombóticas. O risco de DAC também está associado com sexo, idade, dieta, hábito de fumar, estresse e sedentarismo. Dentre as dislipidemias, a hipercolesterolemia tem sido implicada como um dos mais importantes fatores de risco para DAC (Simons, 1986; Kannel *et al.*, 1979; Stamler *et al.*, 1986).

O estudo de Framingham, iniciado no final da década de 40, mostrou que o aumento do colesterol total (CT) e de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e a diminuição do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) são indicadores de risco de DAC (Castelli, 1984). Outro estudo muito importante foi o *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT), da década de 80, no qual foram acompanhados por 6 anos 360.000 indivíduos, que confirmou a hipercolesterolemia, principalmente o aumento da concentração plasmática do LDL-C como fator de risco para DAC, além de estar associado com o aumento dos índices de mortalidade por doença coronariana (Stamler *et al.*, 1986).

A hipercolesterolemia pode ser decorrente de fatores ambientais, como a dieta, o hábito de fumar, a baixa frequência de atividade física, e o estresse, associados a fatores antropométricos, como a idade, o sexo, o índice de massa corpórea (IMC) (Neaton e Wentworth, 1992; Yusuf *et al.*, 2001; Reddy, 2002;

Marmot *et al.*, 1997). Fatores genéticos, como alterações em genes envolvidos no metabolismo lipídico também predisõem a hipercolesterolemia (Yip *et al.*, 2003; Scheuner, 2003; Stein *et al.*, 2002).

A hipercolesterolemia familiar e o defeito de apolipoproteína B familiar são exemplos de doenças monogênicas em que se observa valor elevado da concentração de colesterol sérico e DAC precoce (Goldstein e Brown, 2001). Entretanto, na população em geral, a hipercolesterolemia tem sido associada a variantes genéticas de proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol (Fuentes *et al.*, 1997; Forti *et al.*, 2003; Shimokata *et al.*, 2004). Polimorfismos nos genes da apolipoproteína B (*APOB*), da apolipoproteína E (*APOE*), do receptor de LDL (*RLDL*) e outros têm sido associados com aumento das concentrações plasmáticas de LDL-C e risco de DAC (Shimokata *et al.*, 2004; Forti *et al.*, 2003; Couture, *et al.*, 1999).

No Brasil, estudos de polimorfismos nos genes *APOB* (Guzmán *et al.*, 2000; Cavalli *et al.*, 2000; Machado, *et al.*, 2001), *RLDL* (Salazar *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2000a; Forti *et al.*, 2003) *APOE* (Salazar *et al.*, 2000b) mostraram associação com variações nas concentrações séricas de LDL-C e também com perfil lipídico com alto risco para o desenvolvimento de DAC.

1.2. Tratamento da hipercolesterolemia

A redução da concentração plasmática do colesterol constitui prevenção importante na diminuição do risco de DAC (Jacobson, 2001; Grundy, 2001). Esse fato foi constatado em estudos que avaliaram indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com vastatinas para prevenção primária (WOSCOPS e AFCAPS/TexCAPS) ou secundária (4S, CARE e LIPID) ou de eventos coronarianos (Shepherd *et al.*, 1995; Sacks *et al.*, 1996; LIPID study group, 1988).

O tratamento de pacientes com hipercolesterolemia é iniciado com a orientação dietética (dieta com baixo teor de colesterol e de gorduras saturadas), e mudanças no estilo de vida, como o estímulo a prática de atividade física, o abandono dos hábitos de fumar e de consumir bebidas alcoólicas (Diretrizes

Brasileiras..., 2001; NCEP, 2001). Embora essas medidas promovam redução da concentração plasmática de colesterol, há uma parcela de pacientes que não respondem a essas medidas e necessitam, inclusive, de intervenção terapêutica.

Vários tipos de fármacos têm sido utilizados no tratamento da hipercolesterolemia, entre os quais podemos citar as vastatinas, os sequestrantes de ácidos biliares, os fibratos, o ácido nicotínico, o probucol e recentemente o ezetimibe. Esses fármacos atuam por mecanismos diversos e apresentam efeitos diferenciados sobre o LDL-C, ou sobre os triacilglicéris, ou ainda, sobre o HDL-C (Grundy, 2001; NCEP, 2001).

As vastatinas são inibidores potentes da hidroximetil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, enzima-chave da síntese de colesterol, que resulta na diminuição da concentração intracelular do colesterol (Grundy, 2001). Essa redução ativa as proteases SP1 e SP2, enzimas que 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, pela ligação aos *sterol regulatory element* (SRE), localizados na região promotora do gene *LDL*. O aumento da expressão dos receptores de LDL estimula a endocitose das LDL e diminui a sua concentração plasmática (Goldstein *et al.*, 2002) (Figura 1).

A HMG-CoA redutase converte a HMG-CoA em mevalonato, que é um precursor dos compostos isoprenóides, intermediários da biossíntese de colesterol e envolvidos na sinalização e proliferação celular (Vaughan *et al.*, 2000). Portanto, a inibição da HMG-CoA redutase pelas vastatinas também reduz as concentrações intracelulares de isoprenóides e conseqüentemente promove ação antiinflamatória e antiproliferativa caracterizando alguns dos efeitos pleiotrópicos atribuídos às vastatinas (Hoffman, *et al.*, 2001; LaRosa, 2001). As vastatinas têm ação anti-agregante plaquetária, possivelmente decorrente da diminuição da produção de tromboxane A₂. Essa ação pleiotrópica tem sido associada à estabilização da placa de ateroma formada, pois também é atribuída às vastatinas o reestabelecimento do equilíbrio entre os sistema fibrinolítico e da coagulação (Vaughan *et al.*, 2000; Ambrosi *et al.*, 2003).

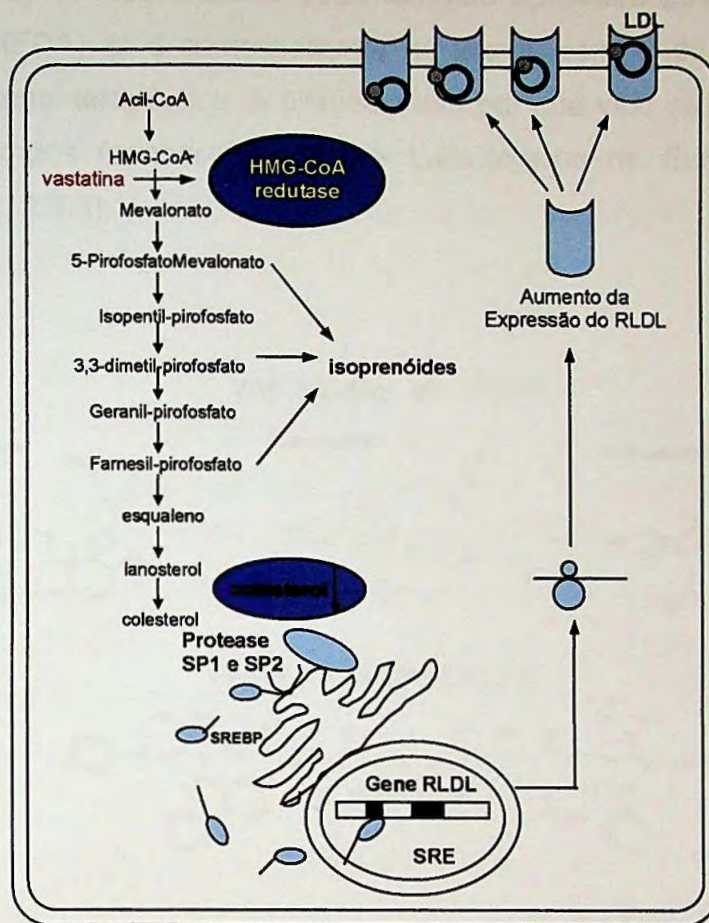


Figura 1. Regulação da síntese intracelular de colesterol. Adaptado de Vaughan e cols. (2000). HMG-CoA: hidroximetil-glutaril coenzima A; SP1 e SP2: proteases; SREBP: *sterol regulatory element-binding protein*; SRE: *sterol regulatory element*.

As vastatinas podem ser classificadas em naturais ou sintéticas. A lovastatina é uma vastatina natural derivada do fungo *Aspergillus terreus* (Alberts *et al.*, 1980), enquanto que a sinvastatina e a pravastatina são produtos naturais modificados. As demais vastatinas (fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina e pitavastatina) são produzidas por síntese orgânica (Schmitz e Drobnik, 2003; Iglesias e Díez, 2003). Na **figura 2** podem ser observadas as estruturas químicas das vastatinas.

No Brasil, as vastatinas de uso comercial são: lovastatina, fluvastatina, pravastatina, sinvastatina e atorvastatina. A cerivastatina foi recentemente retirada do mercado pelo fabricante devido à ocorrência de efeitos adversos fatais (Schmitz

e Drobnik, 2003). A rosuvastatina, recentemente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), já é comercializada no Brasil, compondo, assim, mais um fármaco no arsenal terapêutico. A pitavastatina, por sua vez, se encontra em fase II e III de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos na Europa e no Japão (Iglesias e Díez, 2003).

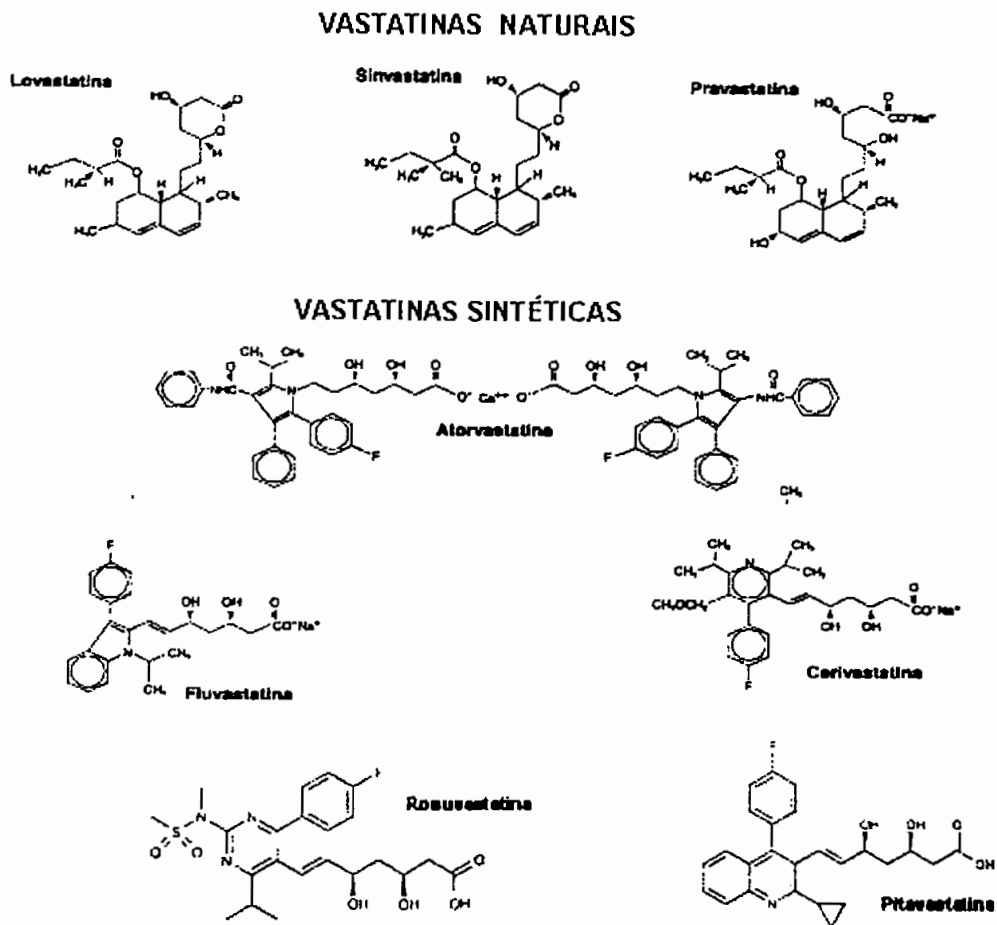


Figura 2. Estrutura química das vastatinas naturais e sintéticas. Adaptado de Christians e cols. (1998) e Iglesias e Díez (2003).

As vastatinas diferem entre si pela potencia para a obtenção de uma mesma ação farmacológica (Schmitz e Drobnik, 2003; Grundy, 2001). A equivalência entre as doses das vastatinas, observada pela mesma porcentagem de redução na concentração sérica do LDL-C, é de 10 mg de atorvastatina, 20 mg de sinvastatina,

40 mg de lovastatina, 80 mg de fluvastatina e 0,4 mg de cerivastatina. A maior eficácia terapêutica, representada pela redução do LDL-C de 65%, é obtida com 80 mg/dia de rosuvastatina (Iglesias e Díez, 2003). A rosuvastatina apresenta maior eficácia do que a atorvastatina nas mesmas doses (Olsson et al., 2002; Davidson et al., 2002) e a pitavastatina aparentemente apresenta eficácia semelhante a da atorvastatina (Iglesias e Díez, 2003).

As vastatinas, geralmente, são muito bem toleradas e bem aceitas pelos pacientes. Os efeitos adversos mais comumente associados a esses farmacoterápicos são a toxicidade muscular (mialgia ou miopatia) e hepática (Jacobson, 2001). O risco de miopatia é aumentado quando há associação das vastatinas com outros medicamentos, como os fibratos, o ácido nicotínico ou a ciclosporina (Vaughan *et al.*, 2000). Outros efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais (flatulência, constipação e dispepsia), dores de cabeça e insônia também tem sido relatados durante a terapia com vastatinas (Malinowski, 1998).

1.3. Fatores que influenciam a resposta farmacológica

Os fatores que modificam a biodisponibilidade dos fármacos, tais como as taxas de absorção, distribuição, metabolização e eliminação, podem afetar de forma significativa a resposta farmacológica, por alteração da concentração plasmática ou da eficácia do composto farmacologicamente ativo (Brinckmann e Eichelbaum, 2001; Hoffman *et al.*, 2001).

A metabolização de fármacos é dependente de ação enzimática e é subdividida em três fases. Na fase I, participam as isoenzimas do citocromo P450 (CYP) que são responsáveis por reações de oxidação dos xenobióticos. Na fase II, estão envolvidas as transferases que adicionam um grupamento químico à estrutura dos xenobióticos. As enzimas envolvidas nessas duas fases transformam os xenobióticos em metabólitos mais hidrossolúveis, facilitando, assim, sua eliminação (Lennernas, 2003). Na fase III, participam as proteínas do sistema de eliminação e efluxo de xenobióticos naturais ou biotransformados. As proteínas da família *ATP Binding Cassete* (ABC) são importantes representantes desta classe

de proteínas (Lennernas, 2003). Os xenobióticos podem ser biotransformados por uma ou mais fases de metabolização (Lennernas, 2003).

A compreensão da biotransformação dos fármacos apresenta grande relevância nos estudos farmacocinéticos, em especial quando associada aos estudos de eficácia e segurança terapêutica, o que permite adequar as doses e os esquemas de administração (Lennernas, 2003). É bem conhecido que diferenças na taxa de biotransformação de um dado fármaco pode variar entre indivíduos. Nos metabolizadores lentos, a maior concentração plasmática do fármaco pode levar a efeitos adversos graves. Já nos metabolizadores rápidos, a menor concentração plasmática pode resultar na ineficácia da terapia (Steimer e Potter, 2002).

Embora as vastatinas sejam os fármacos hipocolesterolemiantes mais eficientes, a resposta farmacológica apresenta variações significantes entre os indivíduos. Em pacientes tratados com vastatinas em que não são atingidos os alvos de redução de LDL-C considerados eficazes e seguros, é administrado o dobro da dose inicial que resulta em redução adicional de LDL-C sérico de 5 a 7%. Para esses pacientes também é utilizada, com freqüência, associação de hipocolesterolemiantes de classes diferentes (Kastelein, 2003). Essas condutas, apesar de muito eficientes, aumentam a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos ou tóxicos por alterarem a cinética de metabolização dos fármacos (Iglesias e Díez, 2003; Brorholt-Petersen *et al.*, 2001). Atualmente, já existem algumas alternativas no arsenal farmacoterápico, como a rosuvastatina que apresenta eficácia terapêutica maior do que a da atorvastatina e o ezetimibe que tem sido utilizado com segurança em associação com vastatinas (Davidson, 2003).

As vastatinas são metabolizadas por isoenzimas do citocromo P450, com exceção da pravastatina que sofre ação de enzimas de fase II (sulfotransferase e glutathiona-S-transferase) gerando metabólitos sulfatados e glicuronidados (Christinas *et al.*, 1998). As vias de biotransformação hepática das vastatinas podem ser observadas na **figura 3**. Dentre essas enzimas, a CYP3A4 é a principal metabolizadora das vastatinas hidroxí-ácidas (atorvastatina, cerivastatina, sinvastatina e lovastatina). A fluvastatina, por outro lado, é principalmente metabolizada pela CYP2C9. A rosuvastatina é metabolizada pelas enzimas

CYP2C9 e CYP2C19 e a pitavastatina é metabolizada pelas CYP2C8 e CYP2C9 (Iglesias e Díez, 2003).

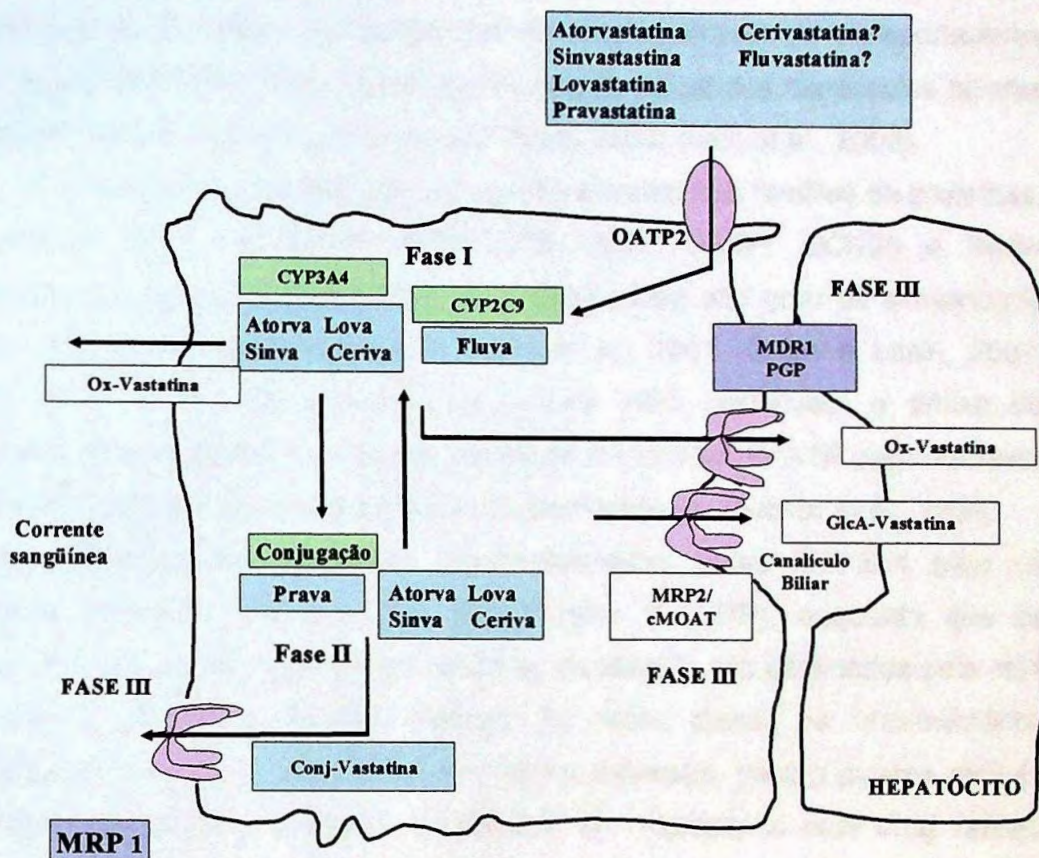


Figura 3. Metabolismo e biotransformação das vastatinas. O OATP2 (*organic anion transporter 2*) é responsável pela interiorização das vastatinas no hepatócito. Glicuronidação prévia por enzimas de fase II parecem favorecer a ação da CYP3A4 (fase I). Adaptado de Schimitz e Drobnik (2003).

A biotransformação das vastatinas hidroxi-ácidas através de oxidação e β -oxidação pela CYP3A4 formando os metabólitos orto- e a para-hidroxi-ácidos parece ser favorecida quando ocorre lactonização prévia da cadeia lateral dos ácidos dihidroxi-heptanoico e dihidroxi-heptenoico comuns a essas vastatinas (Jacobsen *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a lactonização é dependente de glicuronidação prévia por uma uridinil-difosfato-glicuroniltransferase (UGT) (Prueksaritanont *et al.*, 2002). Portanto, a formação de intermediários glicuronidados, indica que as vias de metabolização de fase II estão envolvidas na

farmacocinética das vastatinas (Prueksaritanont *et al.*, 2002; Schmitz e Drobnik, 2003; Mallinowski, 1998).

Os metabólitos das vastatinas gerados pela ação das enzimas de biotransformação de fases I e II podem ser eliminados através de transportadores de membrana da família ABC, localizados na região apical dos canalículos biliares e basolateral dos hepatócitos (Schmitz e Drobnik, 2003; Siest *et al.*, 2003).

Os transportadores ABC são agrupados em sete sub-famílias de proteínas, denominadas ABC1, MDR/TAP, MRP/CFTR, ALD, OABP, GCN20 e White (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>), que apresentam alto grau de similaridade de suas seqüências de aminoácidos (Dean *et al.*, 2001; Oram e Lawn, 2001; Schwab *et al.*, 2003). As proteínas da família ABC promovem o efluxo de xenobióticos e substâncias endógenas utilizando a hidrólise do ATP para bombear estas substâncias contra um gradiente de concentração (Ambudkar *et al.*, 1999).

A eliminação das vastatinas biotransformadas pelas CYP3A4 para os canalículos biliares é mediada pela glicoproteína P (GPP), enquanto que os produtos de conjugação, gerados por enzimas de fase II, são eliminados pela *mult drug related protein 2* (MRP2) (Figura 3). Além disso, os intermediários glicuronidados podem ser eliminados, em menor extensão, para o plasma através de transportadores de membrana basolateral, em especial a *mult drug related protein 1* (MRP1) (Schmitz e Drobnik, 2003).

A atorvastatina, após absorção intestinal, é transportada ao hepatócito através de um transportador de membrana de ânions orgânicos, denominado OATP2 (Lennernas, 2003) (Figura 3). No hepatócito, a principal via de metabolização da atorvastatina é oxidação promovida pela CYP3A4 e, em menor extensão, a glicuronidação pela UGT (Lennernas, 2003). Os produtos de biotransformação da atorvastatina podem ser eliminados pela GPP e MRP2 para os canalículos biliares (Lennernas, 2003). A via de eliminação renal, de menor importância, está associada ao transportador de membrana MRP1 (Schmitz e Drobnik, 2003). Como a eficácia terapêutica está associada à concentração sérica do composto farmacologicamente ativo, a atividade dos transportadores de membrana, envolvidos com a cinética de metabolização da atorvastatina, é relevante na avaliação da resposta terapêutica.

1.4. Genes envolvidos na resposta terapêutica

A variação da resposta farmacológica entre os indivíduos tem vários determinantes que podem ter origem fisiológica (sexo, idade, IMC), fisiopatológica (funções renal, hepática, cardiovascular, pulmonar, entre outras), genética (proteínas de absorção e de transporte plasmático, enzimas metabolizadoras de fármacos, transportadores de membrana, entre outras) ou ambiental (fumo, dieta, álcool, poluentes e outros) (Meisel *et al.*, 2000).

No caso dos agentes hipocolesterolemiantes variantes de genes envolvidos com o metabolismo lipídico ou com a absorção, metabolização e eliminação dos fármacos têm sido associados com a variabilidade na resposta farmacológica (Maitland-van der Zee *et al.*, 2002; Dornbrook-Lavender e Pieper, 2003).

Vários estudos mostraram que alterações em genes envolvidos no metabolismo lipídico (*APOB*, *APOE*, *RLDL* entre outros) têm importante efeito na resposta farmacológica de vastatinas (Salazar, 1999; Guzman *et al.*, 2000; Brorholt-Petersen, 2001; Brinkmann e Eichelbaum, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001; Schmitz e Drobnik, 2003; Siest *et al.*, 2003; Gerdes *et al.*, 2001). Alterações no gene *RLDL*, por exemplo, podem apresentar como consequência redução da expressão de *RLDL* nos hepatócitos ou expressão de receptores defeituosos, que prejudicam a captação e a interiorização das partículas de LDL (Marks, *et al.*, 2003). A eficácia terapêutica das vastatinas é dependente do tipo de mutação presente no gene *RLDL*, como descrito por Brorholt-Petersen e cols. (2001).

Os estudos de genes envolvidos na metabolização de fármacos têm mostrado que variantes do gene da *CYP3A4* estão associados com variabilidade na resposta a atorvastatina (Cavalli, 2003; Kajinami, *et al.*, 2004a).

Variantes genéticas de transportadores ABC, entre os quais estão a *GPP* e a *MRP1*, têm sido associadas com a resposta terapêutica de quimioterápicos, cardiotônicos, antivirais, antibióticos entre outros (Kerb *et al.*, 2001; Sakaeda *et al.*, 2002; Morya *et al.*, 2002; Hoffmeyer *et al.*, 2000; Schmitz e Drobnik, 2003; Lin e Yamazaki, 2003; Marzolini *et al.*, 2004), além de estar envolvidas no metabolismo endógeno de lipídeos e outros metabólitos (Efferth, 2001; Borst e Elferink, 2002).

A *GPP* é um transportador ABC com massa molecular de 160 kDa, composta por dois domínios transmembrana que são sub-divididos em 6 sub-

domínios responsáveis pela afinidade a diferentes substratos (Figura 4). A GPP apresenta também em sua estrutura dois domínios intracelulares de ligação ao ATP, responsáveis pela produção de energia para mediar o efluxo celular (Ambudkar *et al.*, 1999).

A GPP é codificada pelo gene *MDR1* (cromossomo 7q31) (Cole *et al.*, 1992) que contem 28 éxons e uma região promotora (Figura 4), nos quais já foram identificados 29 polimorfismos (Marzolini *et al.*, 2004; Sakaeda, *et al.*, 2002).

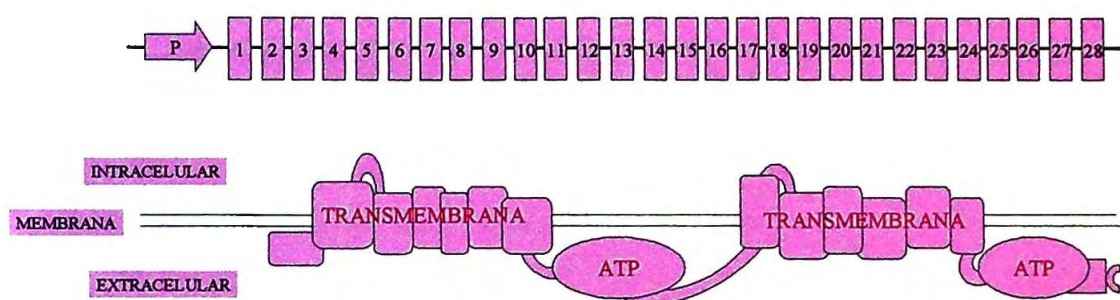


Figura 4. Representação esquemática do gene *MDR1*, (P: região promotora) e da proteína GPP, (dois domínios transmembrana com 6 sub-domínios e dois domínios intracelulares de ligação ao ATP) (Adaptado de Kerb *et al.*, 2001).

A GPP é expressa em tecidos com função excretória (fígado, rins e intestinos) e protetora, como as barreiras hemato-encefálica, placentária, testicular e ovariana (Marzolini *et al.*, 2004; Schinkel e Jonker, 2003; Sun *et al.*, 2003;). A GPP transporta um largo espectro de compostos, estruturalmente não relacionados, para fora das células impedindo, assim, o acúmulo de compostos tóxicos nos tecidos (Ambudkar *et al.*, 1999; Cascorbi, *et al.*, 2001).

A GPP é considerada um fator importante na eliminação de fármacos que são metabolizados pela CYP3A4 (Corsini *et al.*, 1999). Algumas vastatinas que são metabolizadas pela CYP3A4, como a atorvastatina, lovastatina e, em menor grau, a pravastatina, sofrem ação da GPP no processo de eliminação biliar (Corsini *et al.*, 1999; Lennernans, 2003).

A GPP tem também outras funções metabólicas importantes, como a captação de colesterol da dieta pelos enterócitos (Tessner e Stenson, 2000) e

regulação do transporte de colesterol da membrana citoplasmática ao retículo endoplasmático (Field *et al.*, 1998; Tessner e Stenson, 2000). O aumento de expressão da GPP foi associado ao acúmulo de colesterol intracelular em células de cultura de enterócito e em lesões ateroscleróticas (Field *et al.*, 1998; Batetta *et al.*, 1999).

Alguns estudos demonstraram que o aumento da expressão do gene *MDR1* está associado com resistência aos efeitos de vários fármacos que sofrem ação de efluxo celular pela GPP (Ambudkar *et al.*, 1999). Alterações em regiões regulatórias (promotoras ou de *enhancers*) do gene *MDR1* podem afetar a taxa e a eficácia do processamento do pré-mRNA levando a variações na expressão da proteína GPP (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Sakaeda, *et al.*, 2002). Variações na expressão da proteína GPP também estão associadas com diferentes polimorfismos no gene *MDR1* (Mickley *et al.*, 1998; Hoffmeyer *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Sakaeda, *et al.*, 2002).

Polimorfismos do gene *MDR1* têm sido associados à variação na concentração intracelular e na biodisponibilidade de vários fármacos, modificando a resposta farmacológica e tendo implicações potenciais de risco para várias doenças (Kerb *et al.*, 2001; Marzolini *et al.*, 2004).

Foi observado que o polimorfismo C3435T (éxon 26) do gene *MDR1* está relacionado com variação na expressão intestinal e atividade *in vivo* da GPP (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2002). Portanto, o polimorfismo *MDR1* C3435T pode ter um papel funcional na biodisponibilidade de vários fármacos que sofrem ação da GPP, apesar deste polimorfismo ser silencioso, ou seja, não alterar a seqüência de aminoácidos da estrutura da proteína (Cascorbi *et al.*, 2001; Kerb *et al.*, 2001).

Em alguns estudos, foi observado que a freqüência do alelo raro T do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* é maior em indivíduos brancos e asiáticos do que em indivíduos de origem africana (Ameyaw *et al.*, 2001; Schaeffeler *et al.*, 2001; Cascorbi *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Bernal *et al.*, 2003).

Duas outras variantes comuns localizadas no códon 893 (éxon 26) do gene *MDR1*, Ala893Ser (G2677T) e Ala893Treo (G2677A), também foram associadas a variações na concentração intracelular de digoxina em células NIH-3T3 (Kim *et al.*,

2001) e a alterações da resposta farmacológica (Hoffmeyer *et al.*, 2000). A substituição de aminoácidos dessas variantes se encontra no segundo domínio transmembrana da proteína GPP, sítio responsável pela afinidade aos substratos da proteína (Kerb *et al.*, 2001; Ambudkar *et al.*, 1999).

Foi observado que a variante G2677T tem maior frequência que a variante G2677A, em indivíduos brancos (Cascorbi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Fromm, 2002; Moriya *et al.*, 2002; Sakaeda *et al.*, 2002). Além disso, os haplótipos formados pelos polimorfismos C3435T e o G2677A/T parecem ter efeito importante na expressão da proteína GPP em estudos clínicos, modificando a resposta farmacológica a digoxina e a ciclosporina (Chowbay *et al.*, 2003; John *et al.*, 2002). Foi mostrado que os haplótipos formados pelos polimorfismos C3435T e G2677T/A também apresentaram efeito sobre a resposta ao tratamento com atorvastatina em pacientes do sexo feminino (Kajinami *et al.*, 2004b).

A MRP1 é um transportador ABC codificado pelo gene *MRP1*, localizado no cromossomo 16p13.1 (Cole *et al.*, 1992). O gene *MRP1* é composto por 31 éxons e 30 íntrons (**Figura 5**) nos quais já foram identificados mais de 16 polimorfismos (Grant *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2001).

A MRP1 tem massa molecular de 190 kDa e apresenta três domínios transmembrana (**Figura 6**), que determinam a afinidade da proteína a diferentes substratos, e dois domínios intracelulares de ligação ao ATP responsáveis pela produção de energia para efluxo dos substratos (Hipfner *et al.*, 1999). Os domínios transmembrana (MSD1, MSD2 e MSD3) são compostos de cinco, seis e quatro segmentos transmembrana, respectivamente. Os dois domínios intracelulares de ligação ao ATP são denominados NBD1 e NBD2 e estão localizados entre os domínios MSD2 e MSD3 e após o domínio MSD3, respectivamente (Hipfner *et al.*, 1999; Borst, *et al.*, 1999).

A MRP1 é responsável pelo efluxo de vários compostos endógenos (bilirrubina, sais biliares, estrógenos, leucotrienos, prostaglandinas e outros) e de fármacos conjugados com glutatona ou outros ânions orgânicos, como o glicuronato ou sulfato (Hipfner *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 2001; Kerb *et al.*, 2001). A MRP1 também pode estar envolvida na eliminação dos produtos de metabolização de algumas vastatinas, como a atorvastatina ou a pravastina, que sofrem

hidroxilação pela CYP3A4 e conjugação posterior com glicuronato ou com glutationa (Malinowski, 1998; Christians *et al.*, 1998; Jacobsen *et al.*, 2000; Prueksaritanont *et al.*, 2002; Prueksaritanont, 2001).

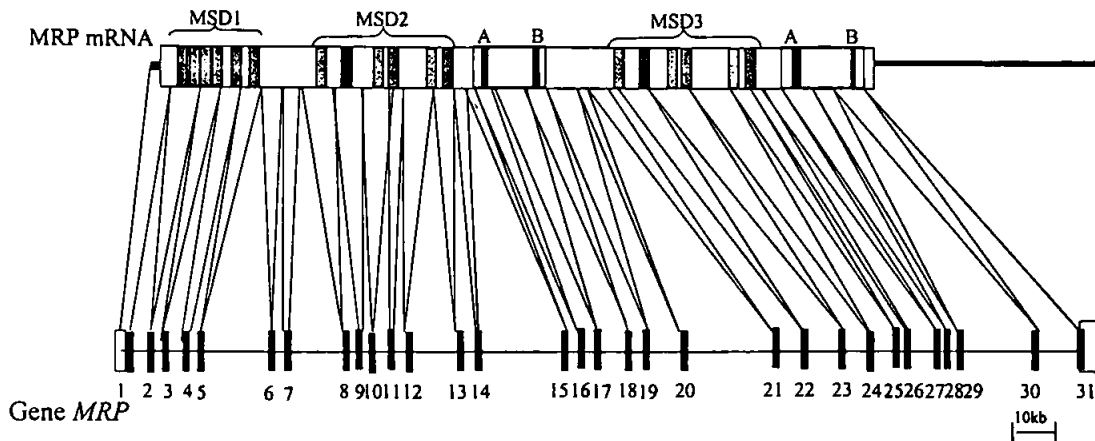


Figura 5. Representação do gene *MRP1* com 31 éxons e seu respectivo RNAm que codifica as diversas regiões da proteína *MRP1*. MSD1, MSD2 e MSD3: domínios transmembrana; A e B: regiões Walker A e B dos domínios de ligação ao ATP. Adaptado de Grant *et al.*, 1997.

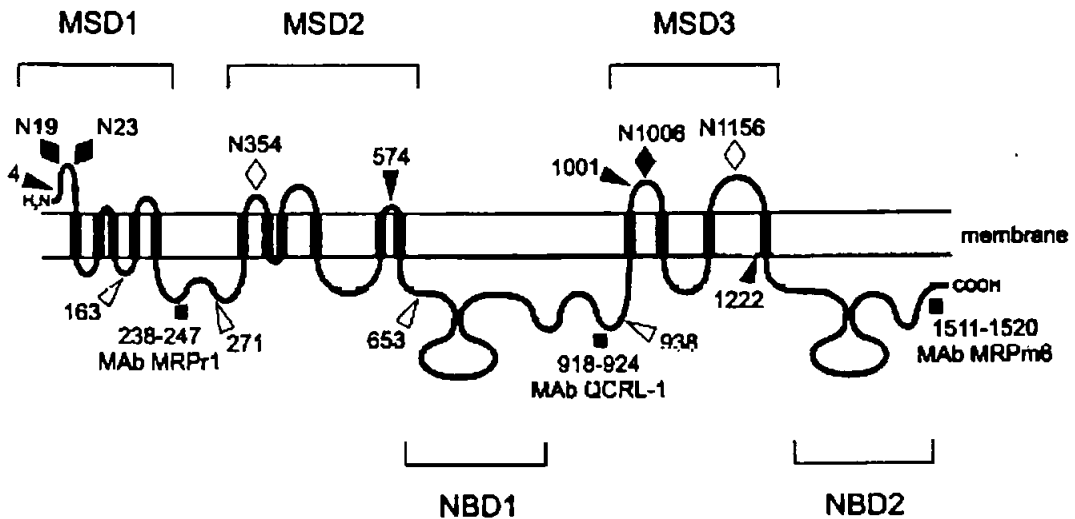


Figura 6. Representação da proteína *MRP1* que apresenta três domínios transmembrana (MSD1, MSD2 e MSD3) e dois domínios citoplasmáticos de ligação ao ATP (NBD1 e NBD2). Adaptado de Hipfner *et al.*, 1999.

A superexpressão do gene *MRP1* tem sido associada ao fenótipo da resistência multifármacos em diferentes linhagens celulares e em diferentes tipos de tumor por modular a taxa de síntese da proteína (Höpfner *et al.*, 1999). Variantes genéticas do *MRP1* têm sido associadas a variações na expressão do RNAm, assim como, com a diminuição da atividade de transporte da proteína (Gao *et al.*, 2000; Szakacs *et al.*, 2000).

Entre os polimorfismos do gene *MRP1*, alguns ocorrem em sítios de clivagem de ATP ou em domínios de interação da proteína MRP1 com substratos (Ito *et al.*, 2001; Morya *et al.*, 2002). O polimorfismo G2012T (éxon 16) que resulta na substituição Gli671Val no NBD1 da proteína foi associado com diminuição da expressão do RNAm em linfócitos do sangue periférico (Conrad *et al.*, 2001). Outros polimorfismos estão associados com processamento do RNAm incorreto do gene *MRP1* que leva à produção de proteína MRP1 modificada, muitas vezes sem atividade, enquanto outros podem afetar a expressão de RNAm do gene *MRP1* (Conrad *et al.*, 2001). Essas alterações levam a perda total ou parcial de atividade da proteína MRP1 que poderia interferir no efluxo de fármacos conjugados com glicuronato, como a atorvastatina.

Com base nessas informações, variantes dos genes *MDR1* e *MRP1* associadas com alterações na expressão gênica podem afetar a biodisponibilidade da atorvastatina e conseqüentemente modificar a sua reposta farmacológica.

A avaliação de polimorfismos dos genes *MDR1* e *MRP1* sobre a expressão gênica e o perfil lipídico sérico podem fornecer informações importantes sobre a variabilidade genética da resposta terapêutica a atorvastatina. Esse conhecimento pode ser futuramente empregado no estabelecimento de marcadores genéticos úteis na individualização da dose e no monitoramento terapêutico de pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de polimorfismos de genes *MDR1* e *MRP1* sobre a expressão gênica e resposta terapêutica em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos polimorfismos dos genes *MDR1* e *MRP1* sobre a expressão do RNAm em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina.
- Analisar os efeitos dos polimorfismos dos genes *MDR1* e *MRP1* sobre as concentrações séricas de lipídeos de indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.
- Avaliar o efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos.

3. Material e Métodos

3.1. Casuística

Foram estudados 76 indivíduos com hipercolesterolemia primária diagnosticada de acordo com os critérios do 3º. Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias (Diretrizes Brasileiras..., 2001), tratados com atorvastatina por quatro semanas.

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, com idade entre 30 e 75 anos, apresentando concentrações séricas de colesterol total superiores a 200 mg/dL, de LDL-C superiores a 160 mg/dL e de triacilgliceróis inferiores a 350 mg/dL. Não foram incluídos no estudo: indivíduos com hipotireoidismo identificado através de critérios clínicos e de determinação sérica de hormônio estimulante da tireóide (TSH) (valor de referência 0,4 a 5,5 μ UI/mL), diabetes melito (glicemia de jejum acima de 120 mg/dL), mulheres em uso de contraceptivos orais e mulheres grávidas.

Os pacientes foram selecionados por médicos da Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, acima descritos. Os pacientes selecionados foram informados sobre o protocolo do estudo, e somente participaram os que aceitaram o convite de participação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Informado (Anexo 1).

O protocolo terapêutico consistiu de período sem medicação e com dieta orientada por 4 semanas. Após esse período, foram administradas 10 mg de atorvastatina, em dose única diária, via oral, por 4 semanas.

O protocolo de estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexos 2 e 3).

Os pacientes hipercolesterolêmicos incluídos no estudo foram caracterizados segundo critérios antropométricos e clínico-laboratoriais e esses dados podem ser observados na **tabela 1**.

Tabela 1: Caracterização da amostra estudada segundo parâmetros antropométricos e avaliação clínico-laboratorial:

Sexo	
Masculino	25 (33%)
Feminino	51 (67%)
Menopausa	46 (92%)
Idade	
<50 anos	13 (17%)
50-59 anos	24 (31%)
60-69 anos	21 (28%)
≥70 anos	18 (24%)
Etnia	
negros	22 (29%)
brancos	54 (71%)
Tabagismo	
fumante	10 (13%)
Ex-fumante	25 (34%)
Não fumante	41 (53%)
Obesidade	
IMC (Kg/cm²)	
<25	24 (32%)
25-29	26 (36%)
≥30	24 (32%)
Hipertensão	51 (67%)
CK	52 ± 30
ALT	20 ± 9
TSH	1,88 ± 1,56

IMC: índice de massa corpórea; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; CK: creatino quinase; ALT: alanina aminotransferase; TSH: hormônio estimulante da tireóide; HDL-C: colesterol de HDL; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-c: colesterol de VLDL; apo AI: apolipoproteína AI ; apo B: apolipoproteína B.

Pode ser observado que os pacientes estudados eram em sua maioria mulheres, representando uma proporção de 2 mulheres:1 homem. Como a faixa etária dos pacientes se situa principalmente entre os 50 a 69 anos (59%) observa-se que a proporção de mulheres menopausadas estudadas foi de 92%. Os pacientes estudados eram em sua maioria de etnia branca (71%).

Dos pacientes estudados, 53% se declararam não fumantes e 34% se declararam ex-fumantes, sendo que os 13% restantes eram fumantes.

Através dos dados da tabela quando se avalia a obesidade através do índice de massa corpórea (IMC), 32% dos pacientes são obesos e 36% encontram-se dentro da faixa de sobrepeso.

Observa-se também, que 67% dos pacientes foram classificados como hipertensos. A hipertensão não foi utilizada como critério de exclusão e os pacientes conhecidamente hipertensos foram mantidos sob terapia anti-hipertensiva. O esquema terapêutico foi específico para cada paciente e os medicamentos anti-hipertensivos utilizados foram: diuréticos (furosemida), diuréticos tiazídicos (hidroclorotiazida, clortalidona), diuréticos poupadores de potássio (espironolactona, amilorida), bloqueadores do canal de cálcio (nifedipina, amlodipina, verapamil, diltiazem), beta-bloqueadores seletivos (atenolol) e não seletivos (propranolol) vasodilatadores (hidralazina, minoxidil), antagonistas da enzima de conversão da angiotensina (enalapril, captopril), bloqueadores de receptores da angiotensina (ibesartam, losartam) bloqueadores centrais (alfa-metildopa).

Através dos dados laboratoriais podemos verificar que os pacientes estudados não apresentaram diabetes melito ou hipotireoidismo, segundo as determinações de glicemia e de TSH. As determinações séricas de alanina aminotransferase (ALT) e creatina quinase (CK) foram utilizadas como parâmetros de monitorização de eventuais efeitos adversos pelo uso de atorvastatina não se caracterizando como critérios de exclusão.

3.2. Amostras biológicas

Durante o estudo, os pacientes foram submetidos a duas coletas de sangue (12 a 14 horas de jejum), sendo a primeira após o período sem medicação e a segunda após o tratamento com atorvastatina.

Na primeira coleta, foram obtidas duas amostras de sangue com K₃EDTA (1 mg/mL), sendo uma de 10 mL para extração de RNA total e a outra de 5 mL para extração de DNA genômico. Foi coletada também uma amostra de 5 mL sem

anticoagulante para obtenção de soro. No soro, as concentrações séricas de lipídeos, apolipoproteínas AI (apoAI) e B (apoB), ALT e CK foram determinadas para avaliação do estado basal dos pacientes.

Na segunda coleta, foi obtida uma amostra de 10 mL de sangue com K₃EDTA (1mg/mL) para a extração de RNA total e uma amostra de 5 mL sem anticoagulante para obtenção de soro, no qual foram determinados os lipídeos e apolipoproteínas para a monitorização da resposta terapêutica, e ALT e CK para avaliação de efeitos adversos.

3.3. Métodos

3.3.1. Determinações bioquímicas e hormonais

As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triacilgliceróis foram determinadas por método enzimático-colorimétrico (Siedel *et al.*, 1993; Sugiuchi, *et al.*, 1995). As concentrações séricas de VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald (Friedwald, 1972).

As determinações ALT e CK foram realizadas por métodos cinéticos no UV (Wroblewski e LaDue, 1956; Karmen, 1955; Horder *et al.*, 1991). A glicemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico (Trinder, 1969).

As determinações de apo AI e de apo B foram realizadas por métodos imunoturbidimétricos (Karl e Engel, 1991; Rifai e King, 1986). Todas essas determinações foram realizadas utilizando *kits* da Roche Diagnóstica (Mannheim, Alemanha), em analisador automático, Hitachi 912 (Roche Diagnostics, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland).

O controle de qualidade das determinações séricas foi realizado pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico comerciais da Roche Diagnóstica (Mannheim, Alemanha).

A determinação de TSH foi realizada por imunensaio através de método imunométrico (Babson, 1991) utilizando analisador automático Immulite (DPC, Los Angeles-EUA) com sistema de detecção por quimioluminescência.

3.3.2. Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina modificado em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 900 μ L do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 μ L do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 μ L de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspendido em 100 μ L do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1mM, pH 8,0) e mantido a $-20^{\circ}C$.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 5 μ L de DNA e 1 μ L de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) (Sambrook *et al.*, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V, por 30 min, utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Posteriormente, as bandas foram visualizadas sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Sambrook *et al.*, 2001b). A fotodocumentação do gel foi realizada por em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) parte integrante do sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA), composto de uma câmera digital de 8 bits acoplada a uma câmara escura.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA) a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} (Sambrook *et al.*, 2001b).

3.3.3. Análise dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos G2677T/A (exon 21) e C3435T (exon 26) do gene *MDR1* e o polimorfismo G2012T (exon 16) do gene *MRP1* foram analisados por amplificação do DNA genômico por reação em cadeia pela polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (RFLP). Os iniciadores foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v.5.0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) com base na seqüência de dados disponível no Gene Bank (*MDR1*: número de acesso M14758; *MRP1*: número de acesso L05628), exceto os iniciadores *anti-sense*, utilizados na reação de PCR-RFLP dos polimorfismos do gene *MDR1*, que foram os descritos por Cascorbi (Cascorbi *et al.*, 2001). Os iniciadores utilizados estão descritos na **tabela 2**.

Foram avaliadas as condições da PCR variando-se: a quantidade de DNA, a quantidade da enzima DNA polimerase, a temperatura de hibridação (em gradiente de temperatura) e o número de ciclos (necessários para a amplificação dos produtos que devem ser detectados na fase exponencial da cinética de reação) (McPherson e Moller, 2000). Na reação de PCR, foram utilizados 50-200 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 0,5-1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e tampão de PCR [(75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L de MgCl_2)], em um volume total de 50 μL . A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 98°C por 3 min; seguida de 30-35 ciclos de amplificação com etapa de desnaturação à 94°C por 1-2 min, hibridação à 55-70°C por 2 min e etapa de extensão à 72°C por 2 min; e extensão final à 72°C por 10 min. A reação de PCR foi realizada em termociclador PTC-200 (M&J Research, Watertown/MA, EUA).

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de PCR-RFLP e de RT-PCR

Gene	Alelo	éxon	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>anti-sense</i>	Frag ^a
MDR1	2677G	21	5'-ttgtttgcaggctataggtcc-3'	5'-attagttgactcacctccc-3' ^b	231
MDR1	2677A	21	5'-ttgtttgcaggctataggtcc-3'	5'-attagttgactcacctccc-3' ^b	231
MDR1	3435T	26	5'-tcctaatctcacagtaactggca-3'	5'-atgaaggcatgtatgtggcct-3' ^b	302
MDR1	Expressão	21-24	5'-agaagtgctgggaagatcgctact-3'	5'-ctcctgactatgccaaagccaa-3'	314 ^c
MRP1	2012G	16	5'-tgaactcagcagtagaaatggaaggaatgt-3'	5'-gccaccacggccaccaaga-3'	218 ^d
MRP1	Expressão	25-29	5'-gccgtggagaggctcaaggagtatt-3'	5'-caggaccctgtttgtttcgggtt-3'	364 ^d
GAPDH	Expressão	2-3	5'-accacagtccatgccatcac-3'	5'-tacagcaacagggtgggtgga-3'	452 ^e

^a tamanho do fragmento (bp).

^b Cascorbi et al., 2001

^c código de acesso M14758 (www.ncbi.nih.nlm.gov/Entrez)

^d código de acesso L05628 (www.ncbi.nih.nlm.gov/Entrez)

^e Tokunaga et al., 1997

Os produtos de PCR gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 5 µL de DNA e 1µL de tampão de amostra de DNA, utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Sambrook *et al.*, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V, por 45 min, utilizando-se fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Posteriormente, as bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook *et al.*, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA).

Para a genotipagem do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* foram necessárias duas reações de restrição enzimática a partir de um único produto de

PCR, uma vez que, neste locus pode ocorrer a troca de G por T (Ala893Ser) ou G por A (Ala893Thr) que possibilita a formação de diferentes perfis de restrição. O produto de PCR contendo o alelo 2677G (893Ala) é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *BshNI* (Figura 7). Na reação de restrição enzimática, foram pipetados 7,5 μ L de produto de PCR, 1 U da enzima *BshNI* e 2,0 μ L de tampão da enzima (tris-acetato a 66 mM, acetato de magnésio a 20 mM, acetato de potássio a 132 mM e BSA a 2 mg/mL, em pH 7,9) em volume final de 20 μ L.

O produto de PCR que contem o alelo 2677A (893Thr) é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *RsaI* (Figura 8). Por sua vez, o alelo 2677T (893Ser) é identificado por exclusão, após a identificação do alelo 2677G ou 2677A. Para a reação de restrição com a enzima *RsaI* foram pipetados 7,0 μ L de produto de PCR, 1 U da enzima e 1,0 μ L de tampão da enzima (tris-acetato a 33 mM, acetato de magnésio a 10 mM, acetato de potássio a 66 mM e BSA a 0,1 mg/mL, em pH 7,9) em volume final de 20 μ L.

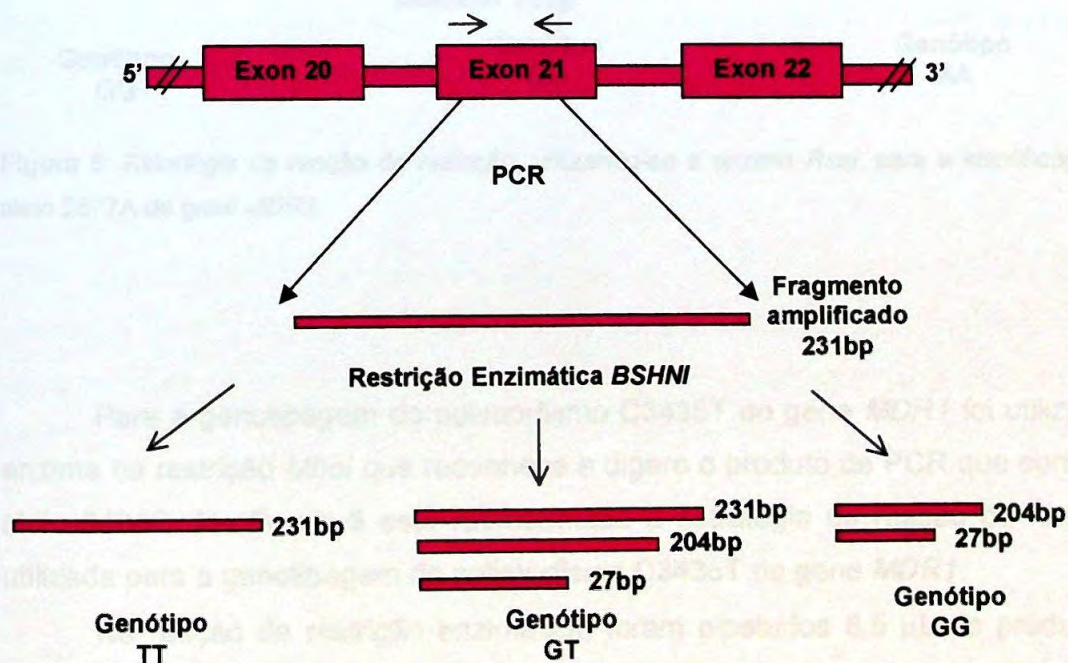


Figura 7: Estratégia da reação de restrição, utilizando-se a enzima *BSHNI*, para a identificação do alelo 2677G do gene *MDR1*.

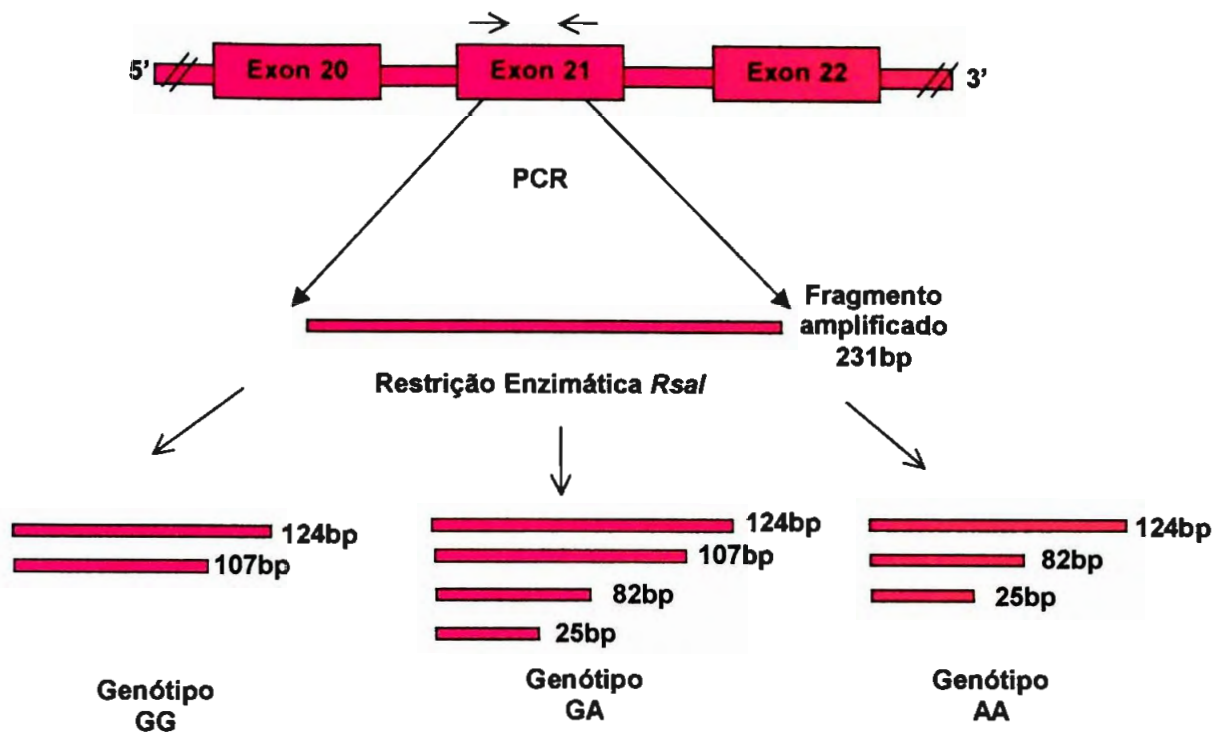


Figura 8: Estratégia da reação de restrição, utilizando-se a enzima *RsaI*, para a identificação do alelo 2677A do gene *MDR1*.

Para a genotipagem do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* foi utilizada a enzima de restrição *MboI* que reconhece e digere o produto de PCR que contem o alelo 3435C. Na **figura 9** está representada a estratégia da reação de restrição utilizada para a genotipagem do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Na reação de restrição enzimática, foram pipetados 8,5 μL do produto de PCR, 1 U da enzima *MboI* e 1,0 μL de tampão da enzima (NaCl a 50mM, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 0,1mM, DTT a 1 mM, BSA a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e glicerol a 50%, em pH 7,4), em volume final de 20 μL .

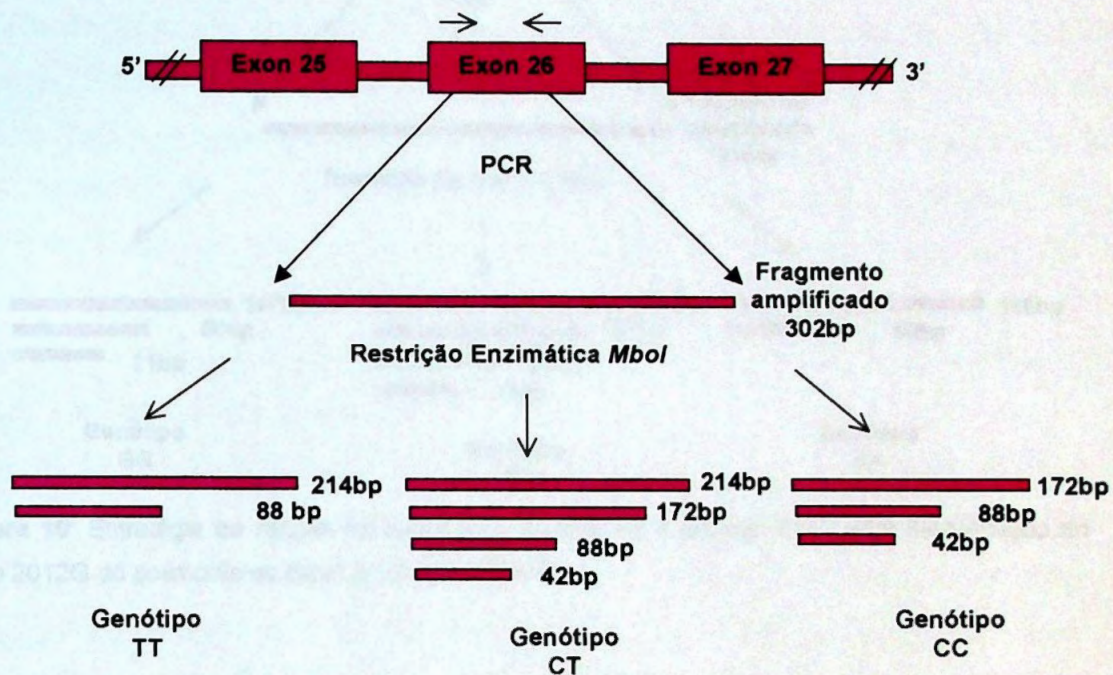


Figura 9: Estratégia da reação de restrição, utilizando-se a enzima *MboI*, para identificação do alelo 3435C do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Para a genotipagem do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* a estratégia foi a criação de um sítio de restrição no fragmento amplificado para reconhecimento da enzima de restrição *RsaI* quando presente o alelo 2012G, mais freqüente, no sítio polimórfico (**Figura 10**). Na reação de restrição enzimática, foram pipetados 5 μ L do produto de PCR, 0,3 U da enzima *RsaI* e 2 μ L do tampão da enzima (33 mM tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 66 mM de acetato de potássio e 0,01 mg/mL de BSA, em pH 7,9) em volume final de 20 μ L. As reações de restrição enzimática foram realizadas por 2h, a 37°C, em banho seco DB-2D (Techne, Duxford, Cambridge, RU).

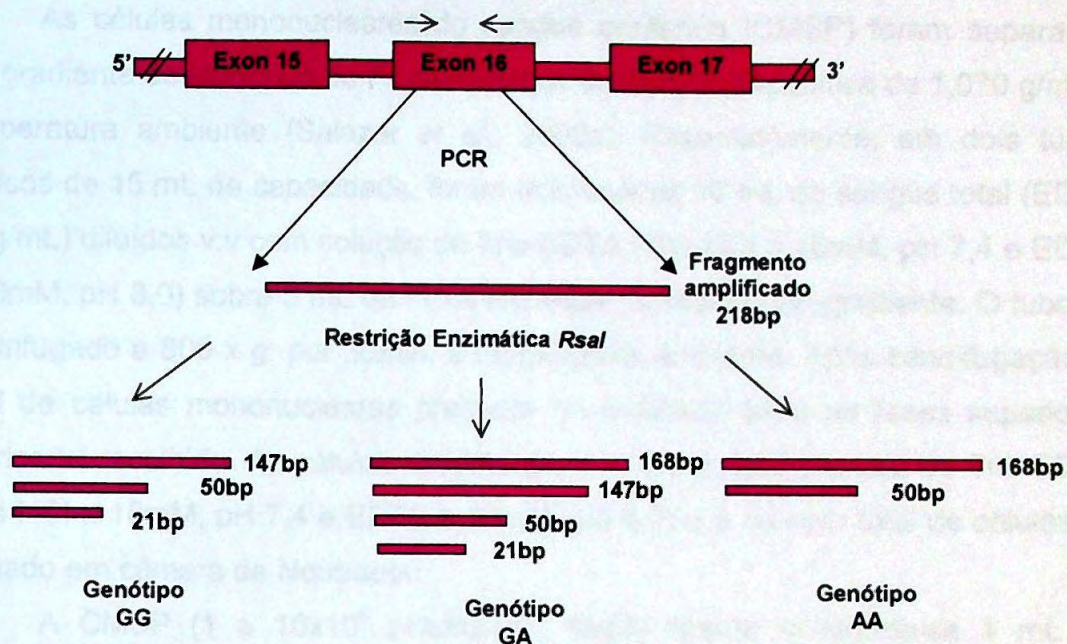


Figura 10: Estratégia da reação de restrição, utilizando-se a enzima *RsaI*, para identificação do alelo 2012G do polimorfismo G2012A do gene *MRP1*.

Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em TBE em cuba de eletroforese vertical (Biometra, Göttingen, Alemanha), aplicando-se 3 μ L de produto de restrição enzimática e 1 μ L de tampão de amostra DNA, utilizando-se como referência marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp (Sambrook *et al.*, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 120V, 15 mA, por 4 hs, utilizando-se fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Os fragmentos foram impregnados com prata e documentados por meio de sistema de digitalização de imagem (HP Scan Jet 3400C, Hewlett-Packard^R, Hong Kong, China).

3.3.4. Extração e avaliação do RNA total:

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque densidade específica de 1,070 g/mL a temperatura ambiente (Salazar *et al.*, 2000c). Resumidamente, em dois tubos cônicos de 15 mL de capacidade, foram adicionados 10 mL de sangue total (EDTA 1mg/mL) diluídos v:v com solução de Tris-EDTA (Tris-HCl a 10mM, pH 7,4 e EDTA a 10mM, pH 8,0) sobre 3 mL de Ficoll-Hypaque, formando um gradiente. O tubo foi centrifugado a 800 x g, por 30min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o anel de células mononucleares presente na interface entre as fases superior e inferior foi recolhido. As células obtidas foram lavadas com solução de Tris-EDTA (Tris-HCl a 10mM, pH 7,4 e EDTA a 10mM, pH 8,0) e o número total de células foi contado em câmara de Neubauer.

A CMSP (1 a 10×10^6 células/mL) foram lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL^R de acordo com o protocolo do fabricante (Gibco BRL, Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, MD, EUA). As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos (mod. 251, Fanem, São Paulo, Brasil), seguidas da adição de 0,2 mL de clorofórmio, homogeneização e centrifugação a 12.000 x g por 15 min, a 4°C em centrífuga refrigerada (5414R, Eppendorff, Hamburg, Alemanha). O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x g, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). Em seguida, o RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL água esterilizada tratada com dietilpircarbonato (DEPC), incubado por 10 min a 56°C, e armazenado a -70°C para posterior análise.

O RNA total isolado foi quantificado (A_{260nm}) e foi avaliado o grau de pureza (A_{260}/A_{280}) através de espectrofotometria no ultravioleta (UV) em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA) (Sambrook *et al.*, 2001). A integridade do RNA das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo formaldeído a 2,2M e tampão MOPS [MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] preparado com água esterilizada preparada com DEPC (Sambrook *et al.*, 2001). A 10 µL de RNA total foi adicionado 4,4 µL de tampão MOPS [MOPS a 100mM (pH 7,0), acetato de sódio a 40 mM e

EDTA a 5 mM (pH 8,0)], 7,8 μ L de formaldeído a 37% e 22 μ L de formamida, incubados a 65°C por 15 min, transferidos para banho de gelo e adicionados 4 μ L de tampão de amostra de RNA (glicerol a 50%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e EDTA 1 mM, pH 8,0), preparado com água com DEPC. As amostras de RNA (10 μ L) foram separadas por eletroforese a 32V por 40 minutos utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Posteriormente, as bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sambrook *et al.*, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura e digitalização de imagem utilizando-se o programa Chemilmager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA).

3.3.5. Ensaio de RT-PCR:

A expressão do mRNA dos genes *MDR1*, *MRP1* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) em CMSP foi quantificada por ensaio de transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR).

As condições da reação de transcrição reversa foram avaliadas variando-se a quantidade inicial de RNA total e a concentração da enzima transcriptase. Para a síntese do cDNA foram realizadas reações na presença 1 a 3 μ g de RNA, 200 ng de oligonucleotídeos aleatórios (*random hexamers*) da Gibco BRL (Life Technologies Inc. Gathersburg, MD, EUA), 100 a 200 UI da enzima SuperScript™ II RT RNase H⁻ (Invitrogen-Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA). Em tubo de 0,5 mL foram adicionados RNA total, 2 μ L de oligonucleotídeos aleatórios (200ng) e o volume foi completado para 12 μ L com água esterilizada e tratada com DEPC. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 65°C por 5 min para desnaturação do RNA e imediatamente resfriados em banho de gelo. A seguir, foram acrescentados 8 μ L de uma mistura contendo a enzima, o tampão de enzima (Tris-HCL a 50 mM, KCl a 75 mM, MgCl₂ a 3 mM), DTT a 10 mM e DNTP a 0,5 mM de e incubados por 10 min a 25°C, seguidos de 50 min a 42°C e 15 min a 70°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Para a PCR foram avaliados o volume de cDNA e as condições da PCR individual para cada gene (*GAPDH*, *MDR1* e *MRP1*), variando-se a temperatura de

hibridação, a concentração dos iniciadores e finalmente, o número de ciclos para detecção de produtos na fase exponencial da cinética de reação. Após essa análise, foram avaliadas as condições da PCR-*duplex*, entre os genes de estudo (*MDR1* e *MRP1*) e o gene constitutivo *GAPDH*. Os iniciadores escolhidos usados para amplificar o cDNA dos genes *MDR1* e *MRP1* (tabela 2) foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v 5,0 (Sigma Chemicals Co, St. Louis , EUA), com base nas seqüências gênicas disponíveis no banco de genes do Gene Bank código de acesso M147558 para o gene *MDR1* e LO5628 para o gene *MRP1* (www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank). Para reduzir a interferência de amplificação de DNA residual foram desenhados iniciadores localizados em diferentes éxons dos genes *MDR1* e *MRP1*. Os iniciadores para amplificar o gene *GAPDH* foram os descritos no trabalho de Tokunaga et al. (1987)

Na reação de PCR, foram utilizados 1 - 2 µL de cDNA, 10 - 20 pmol dos iniciadores dos genes *MDR1* ou *MRP1* e 5 -10 pmol dos iniciadores do gene *GAPDH* (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 1 U de DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e tampão de PCR [(75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM de KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L de MgCl₂)], em um volume total de 50 µL. A reação de amplificação, para ambos os genes, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 98^oC por 3 min; seguida de 20 - 45 ciclos de amplificação com etapa de desnaturação à 94^oC por 1 min, hibridação à 56 - 62^oC por 1 min e etapa de extensão à 72^oC por 2 min; e extensão final à 72^oC por 10 min. A reação de PCR foi realizada em termociclador PTC-200 (M&J Research, Watertown/MA, EUA).

Os produtos de RT-PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, adicionando-se 2 µL de tampão de amostra de DNA a 10 µL de produto de RT-PCR. As amostras, assim preparadas, foram separadas por eletroforese em tampão TBE por 30 minutos a 100V (Amershan Pharmacia Biotech AB, Minesota/CA, EUA). Posteriormente, as bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) utilizando-se como referência um marcador de DNA de tamanho molecular de 100 bp (Amershan Bioscience, Piscataway/NJ, EUA) (Sambrook *et al.*, 2001) e fotodocumentadas em sistema de digitalização e captura de imagem utilizando-se o programa

Chemilmager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA). As leituras de densidade óptica das bandas eletroforéticas foram quantificadas. Para essa quantificação foram determinadas e padronizadas as condições de aquisição de imagens, utilizando-se como critério a nitidez da imagem obtida das bandas. Para a análise densitométrica das bandas, dos produtos de RT-PCR obtidas para os pacientes, foi fixada a área a ser analisada, que foi possível devido as condições de aquisição de imagens previamente padronizadas.

3.3.6 Medida semiquantitativa da expressão gênica do *MDR1* e *MRP1*

A medida da expressão do RNAm de *MDR1* e *MRP1* foi obtida em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do *MDR1* ou *MRP1* e a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do *GAPDH*.

O sinal amplificação do gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado para o cálculo da expressão relativa, pelo fato do referido gene ser expresso de forma constante e abundante nas células de mamíferos (Bustin, 2000).

3.3.7. Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP e RT-PCR:

As amplificações realizadas pela técnica de PCR foram monitorizadas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto a amostra de DNA ou cDNA) em cada conjunto de reações. Também foram repetidas 10% das reações de PCR, aleatoriamente.

Os produtos de PCR-RFLP apresentam em sua seqüência um sítio de reconhecimento da enzima de restrição, denominado sítio constitutivo, que permite a avaliação da atividade enzimática durante a reação de restrição, sendo um controle útil da reação.

Os ensaios de RT-PCR para cada amostra foram realizados em triplicata.

3.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SigmaStat (para Windows v 2.03) (SPSS Inc., Chicago/IL EUA).

Para análise das frequências dos genótipos e dos alelos foi utilizado o teste de qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher (Rosner, 1986). A relação entre as frequências gênicas e genotípicas (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) foi também verificada pelo teste de qui-quadrado (Beiguelman, 1995).

Para análise comparativa dos parâmetros bioquímicos ou de expressão gênica entre 2 grupos foi utilizado o teste *t* de Student, e entre 3 ou mais grupos, foi utilizada a Análise de Variância. Para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica (\log_{10}) e utilizado os testes acima descritos. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise dos dados dos pacientes estudados

Para a análise dos polimorfismos genéticos os pacientes estudados foram agrupados segundo a etnia, uma vez que 29% dos pacientes eram de etnia negra.

Dentre os indivíduos de etnia negra, apenas dois eram do sexo masculino, por outro lado nos indivíduos de etnia branca, a relação foi de 1 homem:1,34 mulher, ou seja, praticamente 1:1. A idade, o índice de massa corpórea (IMC) e a proporção de obesos foi semelhante entre os grupos étnicos estudados. Como a hipertensão não foi critério de exclusão, observamos nos pacientes incluídos no estudo, a maior frequência de hipertensos entre os negros, porém, a pressão arterial sistólica e diastólica não se mostrou diferente entre os grupos étnicos, provavelmente devido a terapia anti-hipertensiva.

Ao analisar o perfil lipídico basal dos indivíduos hipercolesterolêmicos incluídos no estudo segundo a etnia, observou-se que os brancos apresentaram concentrações séricas de triacilgliceróis e de VLDL-C superiores às encontradas nos indivíduos de etnia negra. Por outro lado, a concentração sérica de HDL-C foi superior nos negros.

As características antropométricas e clínico-laboratoriais dos pacientes agrupados segundo a etnia podem ser observadas na **tabela 3**.

Tabela 3. Características antropométrica e clínico-laboratoriais dos pacientes com hipercolesterolemia primária incluídos no estudo segundo a etnia.

	Negros (22)	Branco (54)	P*
Homens/mulheres	2/20	23/31	$\chi^2=6,50$ ($p=0,01$) 1gl
Idade (anos)	61 ± 10	59 ± 12	0,401
IMC (Kg/cm ²)	28 ± 4	28 ± 5	0,792
Obesos (%)	36 %	41%	$\chi^2=0,34$ ($p=0,56$) 1gl
PAS (mmHg)	141 ± 20	135 ± 23	0,252
PAD (mmHg)	90 ± 14	86 ± 12	0,331
Hipertensos (%)	77 %	63 %	$\chi^2=4,02$ ($p=0,045$) 1gl
Colesterol total (mg/dL)	297 ± 42	285 ± 42	0,282
Triacilgliceróis (mg/dL)	129 ± 39	186 ± 75	0,001
HDL-C (mg/dL)	62 ± 15	51 ± 14	0,002
LDL-C (mg/dL)	209 ± 35	198 ± 39	0,169
VLDL-C (mg/dL)	26 ± 8	37 ± 15	0,001
ApoA1 (mg/dL)	130 ± 22	122 ± 22	0,185
ApoB (mg/dL)	140 ± 22	142 ± 20	0,728

Número de indivíduos entre parêntesis. IMC: índice de massa corpórea; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; CK: creatino quinase; ALT: alanina aminotransferase; TSH: hormônio estimulante da tireóide; HDL-C: colesterol de HDL; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apo A1: apolipoproteína A1; apo B: apolipoproteína B. χ^2 : qui quadrado; gl: graus de liberdade; * teste *t* de Student, os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

4.2. Análise dos polimorfismos genéticos

Para análise dos polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1* e G2012T do gene *MRP1* foram testadas diferentes condições nas reações de PCR, conforme descrito em material e métodos.

Após padronização da reação para amplificação dos produtos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T, as condições adotadas foram as seguintes: o meio de reação continha 50 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores, 0,8 mmol/L de dNTPs, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e tampão de PCR em um volume total de 50 μ L. A PCR consistiu de etapa de desnaturação inicial à 98 $^{\circ}$ C por 3 min; seguida de 35 ciclos de amplificação com etapa de desnaturação à 94 $^{\circ}$ C por 1 min, hibridação à 60 $^{\circ}$ C por 2 min e etapa de extensão à 72 $^{\circ}$ C por 2 min; e extensão final à 72 $^{\circ}$ C por 10 min.

Na figura 11, é mostrado o produto de PCR (302bp) digerido com a enzima de restrição *MboI* gerando os fragmentos que caracterizam os genótipos do polimorfismo C3435T. O genótipo CC é caracterizado pela presença dos fragmentos de 88 e 172 bp (figura 8, linhas 1, 2, 3 e 5); o genótipo CT é caracterizado pela presença dos fragmentos de 88, 172 e 214 bp (figura 8, linhas 4 e 6); o genótipo TT caracterizado pela presença dos fragmentos de 88 e 214 bp (figura 8, linha 7). Nesta figura, podemos verificar a presença do fragmento de 88 bp em todos os genótipos, caracterizando o sítio constitutivo para a *MboI* no produto de PCR que serve de controle da atividade enzimática.

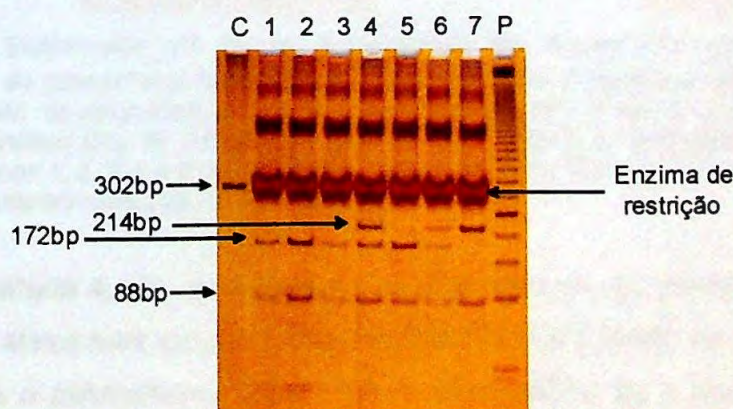


Figura 11: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% corado com prata do produto de amplificação do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*; linhas 1, 2, 3 e 5: genótipo CC; linhas 4 e 6: genótipo CT; linha 7: genótipo TT; linha P: padrão de tamanho molecular de 50 bp; linha C: produto de PCR.

Na figura 12 são observados os produtos de PCR (231bp) digeridos com as enzimas de restrição *BshNI* (figura 12A) e *RsaI* (figura 12B) gerando fragmentos que caracterizam os polimorfismos G2677T e G2677A, respectivamente. Na figura 9A, a presença do fragmento de 204 bp caracteriza o genótipo GG (figura 9A, linhas 3, 5 e 7); a presença dos fragmentos de 231 e 204 bp caracterizam o genótipo GT (figura 9A, linhas 2, 4 e 6) e um fragmento único de 231 bp (produto de PCR não digerido) caracteriza o genótipo TT (figura 12A, linha 1); Na figura 12B, a presença dos fragmentos de 124 e 107 bp caracterizam o genótipo GG (figura 12B, linhas 1, 2, 3, 5 e 6); a presença dos fragmentos de 124, 107 e 82 bp caracterizam o genótipo GA (figura 12B, linha 4) e os fragmentos de 124 e 82 bp caracterizam o genótipo AA (não encontrado).

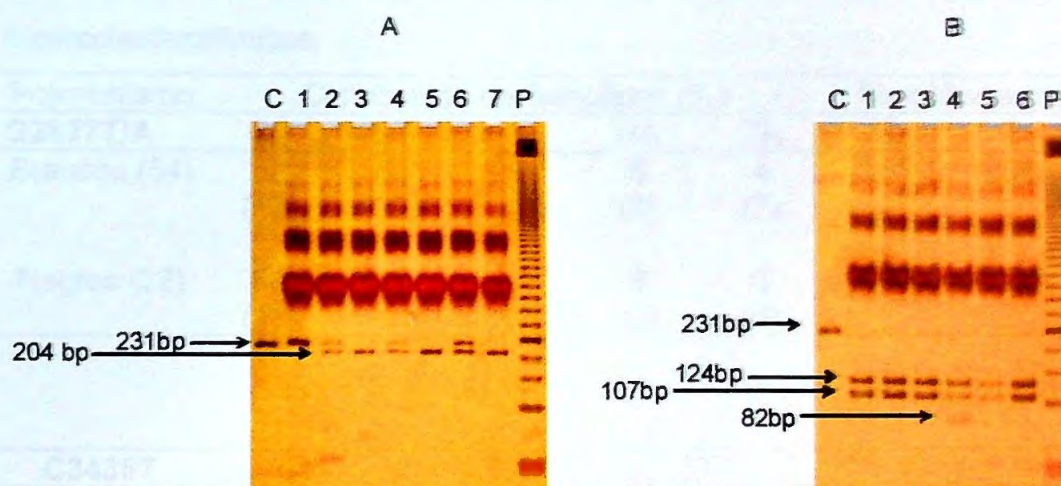


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com prata dos produtos de amplificação do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1*. **A:** Fragmentos gerados pela enzima de restrição *BshNI* do polimorfismo G2677T - linha 1: genótipo TT; linhas 2, 4 e 6: genótipo GT; linhas 3, 5 e 7: genótipo GG; **B:** Fragmentos gerados pela enzima de restrição *RsaI* do polimorfismo G2677A - linhas 1, 2, 3, 5 e 6: genótipo GG; linha 4: genótipo GA; linha C: produto de PCR; linha P, padrão de tamanho molecular de DNA (50 bp).

Na tabela 4, são apresentadas as distribuições dos genótipos e a frequência relativa de alelos para os polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1*.

Para o polimorfismo G2677T/A, o alelo 2677G foi o mais frequente (62%) nos indivíduos estudados, o alelo 2677T teve frequência de 33% e o alelo 2677A de 5%. As frequências alélicas foram similares entre os indivíduos de etnia branca

e negra ($\chi^2=1,92$, $p=0,38$). Por outro lado, a distribuição dos genótipos G2677T/A dos brancos foi diferente dos negros ($\chi^2=17,1$, $p=0,02$). Os indivíduos de etnia branca apresentaram maior frequência do genótipo GT (50%), enquanto que nos indivíduos de etnia negra o genótipo GG (50%) foi o mais frequente.

Para o polimorfismo C3435T, o alelo 3435C foi o mais frequente (57%), enquanto que o alelo 3435T apresentou frequência de 43%. As frequências alélicas e a distribuição dos genótipos não foram diferentes entre os grupos étnicos dos pacientes estudados. Entretanto, observa-se que o genótipo CT nos brancos apresenta uma tendência a uma maior frequência do que nos negros (brancos:52% vs. negros:41%, $\chi^2=3,00$, $p=0,223$)

Tabela 4. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1* dos indivíduos hipercolesterolêmicos.

Polimorfismo	Distribuição de Genótipos (%)					Frequência de Alelos		
	GG	GT	TT	GA	TA	G	T	A
G2677T/A								
Brancos (54)	32 (17)	50 (27)	9 (5)	5 (3)	4 (2)	0,59	0,36	0,05
Negros (22)	50 (11)	27 (6)	14 (3)	9 (2)	0 (0)	0,68	0,27	0,05
	$\chi^2=17,1$ (4 gl, $p=0,002$)					$\chi^2=1,92$ (2 gl, $p=0,382$)		
C3435T	CC	CT	TT	C	T			
Brancos (54)	30 (16)	52 (28)	18 (10)	0,56	0,44			
Negros (22)	41 (9)	41 (9)	18 (4)	0,61	0,39			
	$\chi^2=3,00$ (2 gl, $p=0,223$)					$\chi^2=0,330$ (1 gl, $p=0,566$)		

Número de indivíduos entre parêntesis.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

G2677T/A: brancos, $\chi^2 = 1,588$ (3 gl, $p>0,05$); negros, $\chi^2 = 2,666$ (3 gl, $p>0,05$)

C3435T: brancos, $\chi^2 = 0,234$ (2 gl, $p>0,05$); negros, $\chi^2 = 0,414$ (2 gl, $p>0,05$)

Após padronização da reação de PCR para amplificação dos produtos do polimorfismo G2012T do gene *MRP1*, as condições adotadas foram as seguintes: o meio de reação continha 50 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores, 0,8 mmol/L de dNTPs, 1,0 unidade de Taq DNA polimerase e tampão de PCR em um volume total de 50 μ L. A PCR consistiu de etapa de desnaturação inicial à 98 $^{\circ}$ C por 3 min; seguida de 36 ciclos de amplificação com etapa de desnaturação à 94 $^{\circ}$ C por 1 min, hibridação à 68 $^{\circ}$ C por 1 min e etapa de extensão à 72 $^{\circ}$ C por 2 min; e extensão final à 72 $^{\circ}$ C por 10 min.

Na figura 13, observa-se o produto de PCR (218 bp) digerido com a enzima de restrição *RsaI* gerando os fragmentos que caracterizam os genótipos do polimorfismo G2012T. O genótipo GG é caracterizado pela presença dos fragmentos de 50 e 147 bp (figura 11, linhas 1, 3, 4, 5, 6 e 7); o genótipo GT é caracterizado pela presença dos fragmentos de 50, 147 e 168 bp (figura 11, linha 2); o genótipo TT caracterizado pela presença dos fragmentos de 50 e 168 bp, não foi encontrado. Nesta figura, podemos verificar a presença do fragmento de 50 bp em todos os genótipos, caracterizando o sítio constitutivo para *RsaI* no produto de PCR que serve de controle positivo da reação de restrição.

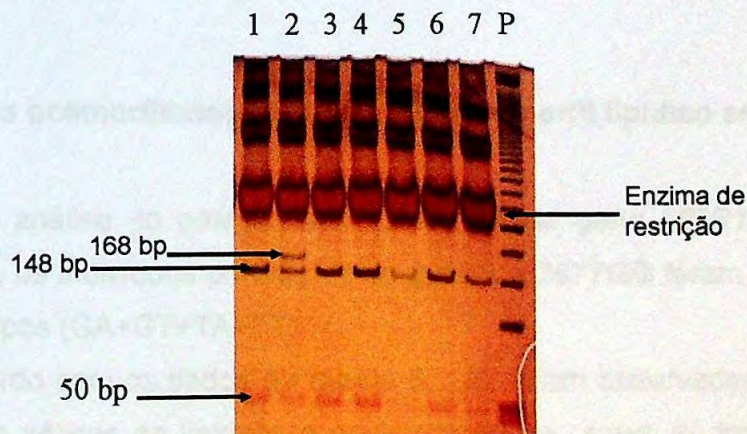


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com prata dos produtos de amplificação do polimorfismo G2012T do gene *MRP1*. Fragmentos gerados pela enzima de restrição *RsaI* do polimorfismo G2012T - linhas 1, 3, 4, 5, 6 e 7: genótipo GG; linha 2: genótipo GT; linha P, padrão de tamanho molecular de DNA (50 bp).

Na **tabela 5**, são apresentadas as distribuições dos genótipos e a frequência relativa de alelos para os polimorfismos G2012T do gene *MRP1*. O alelo 2012G foi o mais freqüente (95%) e alelo 2012T o mais raro (5%). A distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos do polimorfismo não foram diferentes entre os indivíduos das duas etnias estudados.

Tabela 5. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos G2012T do gene *MRP1* dos indivíduos hipercolesterolêmicos.

Polimorfismo	Distribuição de Genótipos (%)			Frequência de Alelo	
	GG	GT	TT	G	T
G2012T					
Brancos (54)	89 (48)	11 (6)	0 (0)	0,94	0,06
Negros (22)	91 (20)	9 (2)	0 (0)	0,95	0,05
$\chi^2=0,056$ (1 gl, $p=0,814$)			$P=1,00$		

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

G2012T: brancos, $\chi^2 = 0,0031$ (3 gl, $p>0,05$); negros, $\chi^2 = 0,0050$ (3 gl, $p>0,05$)

4.3. Efeito dos polimorfismos genéticos sobre o perfil lipídico sérico basal

Para a análise do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* sobre o perfil lipídico sérico, os indivíduos portadores do genótipo 2677GG foram separados dos demais genótipos (GA+GT+TA+TT).

De acordo com os dados da **tabela 6**, não foram observadas diferenças de concentrações séricas de lipídeos e apolipoproteínas, antes do tratamento, entre os portadores do genótipo 2677GG e não portadores ($p>0,05$). Além disso, resultados similares foram encontrados quando os indivíduos foram agrupados segundo a etnia (**figura 14; tabelas 21 e 22, Anexo 4**). Esses resultados sugerem que o polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* não está associado a variações nas

concentrações séricas de lipídeos e apolipoproteínas de indivíduos hipercolesterolêmicos.

Tabela 6. Concentrações séricas basais de lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) entre indivíduos com hipercolesterolemia primária portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos G2677T/A		P*
	GG (28)	GT+TT+GA+TA (48)	
Colesterol total	287 ± 37	290 ± 44	0,825
Triacilgliceróis	156 ± 63	177 ± 75	0,233
HDL-C	55 ± 15	54 ± 15	0,598
LDL-C	201 ± 33	201 ± 41	0,843
VLDL-C	31 ± 13	35 ± 15	0,247
ApoAI	124 ± 19	125 ± 24	0,912
ApoB	143 ± 18	141 ± 21	0,645

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

hipercolesterolemia

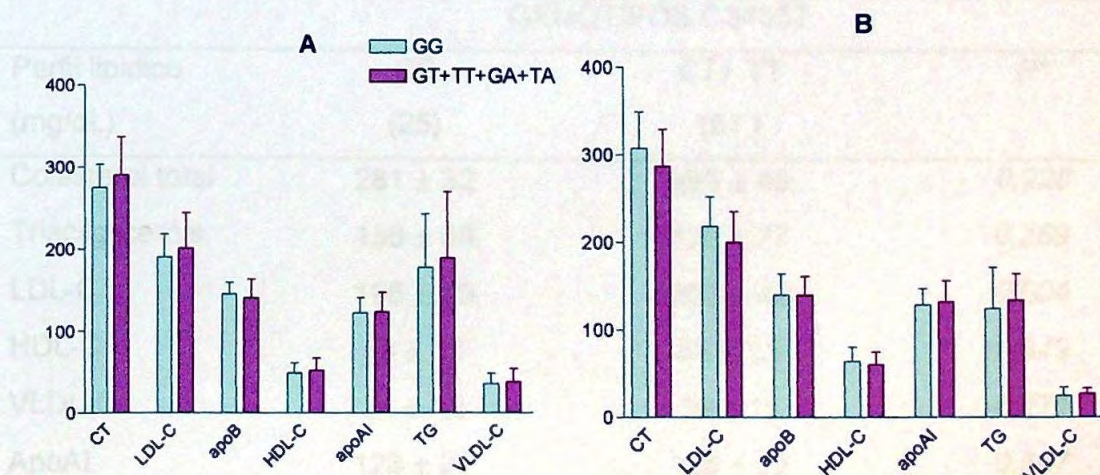


Figura 14: Concentração dos lipídeos séricos basais de acordo com o genótipo do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* em hipercolesterolêmicos de etnia branca (A) e de etnia negra (B). CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da LDL; TG: triacilgliceróis; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C:

colesterol da HDL; apo AI: apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B. (Dados expressos na tabelas 20 e 21, anexo 4)

Para a análise do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* sobre o perfil lipídico sérico, os indivíduos portadores do genótipo 3435CC foram separados dos portadores do alelo T (genótipos CT+TT).

De acordo com os dados da **tabela 7**, as concentrações séricas basais de lipídeos e apolipoproteínas dos portadores do genótipo 3435CC foram similares as dos portadores do alelo 3435T ($p>0,05$). Também não foram observadas diferenças entre indivíduos do sexo masculino e feminino (dados não mostrados). Entretanto, quando os indivíduos foram agrupados segundo a etnia, observou-se que no grupo de negros a concentração sérica de apoAI foi maior nos indivíduos portadores do alelo 3435T (**tabela 8, figura 15B**), o que não ocorreu no grupo de brancos (**figura 15A; anexo 5 tabela 22**). Esses resultados sugerem que o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* pode estar associado a variações na concentração sérica de apoAI de indivíduos hipercolesterolêmicos de etnia negra.

Tabela 7. Concentrações séricas de lipídeos (média±DP) de acordo com os diferentes genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* nos indivíduos com hipercolesterolemia.

Perfil lipídico (mg/dL)	GENÓTIPOS C3435T		P*
	CC (25)	CT+ TT (51)	
Colesterol total	281 ± 32	293 ± 45	0,228
Triacilgliceróis	156 ± 59	176 ± 77	0,269
LDL-C	196 ± 29	203 ± 42	0,504
HDL-C	53 ± 15	54 ± 15	0,849
VLDL-C	31 ± 12	35 ± 15	0,271
ApoAI	123 ± 23	125 ± 22	0,667
ApoB	140 ± 18	142 ± 22	0,622

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste t de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

Tabela 8. Concentrações séricas de lipídeos (média±DP) de acordo com os diferentes genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* nos indivíduos com hipercolesterolemia de etnia negra.

Perfil lipídico (mg/dL)	GENÓTIPOS C3435T		P*
	CC (9)	CT+TT (13)	
Colesterol total	289 ± 39	303 ± 44	0,457
Triacilgliceróis	132 ± 41	127 ± 39	0,778
LDL-C	207 ± 33	211 ± 37	0,770
HDL-C	56 ± 13	66 ± 16	0,124
VLDL-C	26 ± 8	25 ± 8	0,760
ApoAI	117 ± 17	139 ± 20	0,016
ApoB	137 ± 20	142 ± 24	0,625

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

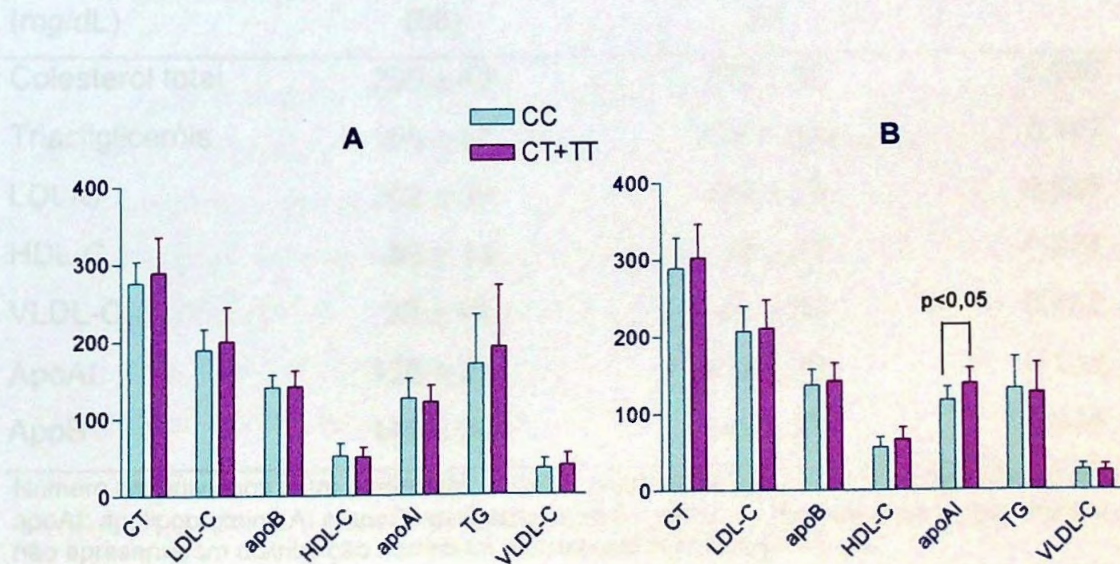


Figura 15: Concentração dos lipídeos séricos basais de acordo com o genótipo do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* em hipercolesterolêmicos de etnia branca (A) e de etnia negra (B). CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da LDL; TG: triacilgliceróis; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apo AI: apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B.

Para a análise do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* sobre o perfil lipídico sérico, os indivíduos portadores do genótipo GG foram separados dos portadores do genótipo GT, pois nos pacientes estudados não foi encontrado o genótipo TT.

De acordo com os dados da **tabela 9**, não foram observadas diferenças de concentrações séricas de lipídeos e apolipoproteínas, antes do tratamento, entre os portadores dos genótipos 2012GG e 2012GT ($p>0,05$). Esses resultados sugerem que o polimorfismo G2012T do gene *MRP1* não está associado a variações nas concentrações séricas de lipídeos e apolipoproteínas de indivíduos hipercolesterolêmicos (**Tabela 9, fig 16**).

Tabela 9. Concentrações séricas de lipídeos (média±DP) de acordo com os diferentes genótipos do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* nos indivíduos hipercolesterolêmicos estudados.

Perfil Lipídico (mg/dL)	GENÓTIPOS G2012T		P*
	GG (68)	GT (8)	
Colesterol total	290 ± 42	282 ± 39	0,630
Triacilgliceróis	165 ± 67	209 ± 100	0,187
LDL-C	202 ± 39	193 ± 25	0,585
HDL-C	55 ± 14	48 ± 21	0,074
VLDL-C	33 ± 13	42 ± 20	0,182
ApoAI	126 ± 21	114 ± 30	0,133
ApoB	141 ± 20	141 ± 23	0,944

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

Tabela 10. Concentração dos lipídios e apolipoproteínas séricas (mg/dL) antes e após administração de atorvastatina (20mg/dia) e a porcentagem da resposta nos pacientes.

Perfil Lipídico (mg/dL)
 Colesterol total
 Triacilgliceróis
 HDL-C
 LDL-C
 VLDL-C

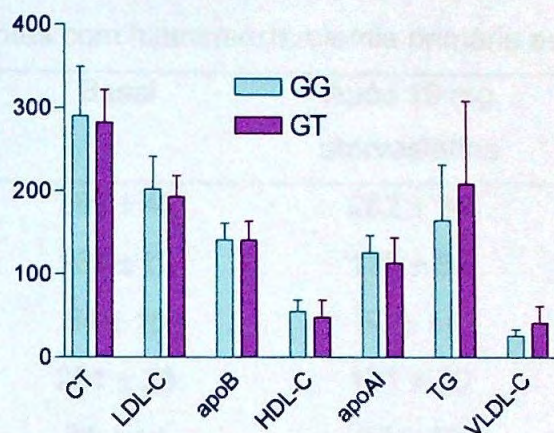


Figura 16: Concentração dos lipídeos séricos básicos de acordo com o genótipo do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* em indivíduos hipercolesterolêmicos. CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da LDL; TG: triacilgliceróis; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apo AI: apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B.

4.4. Efeito dos polimorfismos genéticos sobre o perfil lipídico sérico após o tratamento com atorvastatina

Após o tratamento com atorvastatina observou-se redução significativa de colesterol total (-30%), do LDL-C (-39%) e da apoB (-29%) séricos, alvos da terapia com vastatinas (**tabela 10**). Adicionalmente houve reduções importantes nas concentrações séricas de triacilglicerol (-16%) e do VLDL-C (-17%) e alterações não significativas do HDL-C (-1%) e da apoAI (-2%). Os pacientes foram agrupados segundo a etnia para avaliar a possível influência sobre a resposta terapêutica e não foram observadas diferenças entre os dois grupos étnicos estudados. Na **tabela 11**, podem ser observadas as reduções relativas dos lipídeos e apolipoproteínas séricos segundo a etnia.

Tabela 10. Concentração dos lipídeos e apolipoproteínas séricos (média±DP) antes e após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) e a porcentagem de resposta nos pacientes com hipercolesterolemia primária estudados.

Perfil Lipídico (mg/dL)	Basal	Após 10 mg atorvastatina	P*	Resposta (%)
Colesterol total	289 ± 42	202 ± 34	<0,001	-30 ± 10
Triacilgliceróis	169 ± 72	135 ± 54	<0,001	-16 ± 23
HDL-C	54 ± 15	53 ± 14	0,209	-1 ± 12
LDL-C	201 ± 38	121 ± 30	<0,001	-39 ± 13
VLDL-C	34 ± 14	27 ± 10	<0,001	-17 ± 23
ApoAI	125 ± 22	126 ± 21	0,429	-2 ± 11
ApoB	141 ± 20	99 ± 19	<0,001	-29 ± 13

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. *teste *t Student* pareado.

Tabela 11. Variação relativa das concentrações de lipídeos e apolipoproteínas séricas (média±DP) dos indivíduos com hipercolesterolemia primária após tratamento com atorvastatina (10mg/d/4sem).

Peril Lipídico (mg/dL)	Brancos (54)	Negros (22)	P*
Colesterol Total	-0,30 ± 0,09	-0,29 ± 0,11	0,662
Triacilgliceróis	-0,20 ± 0,24	-0,06 ± 0,18	0,656
HDL-C	-0,01 ± 0,10	-0,01 ± 0,14	0,958
LDL-C	-0,39 ± 0,13	-0,40 ± 0,14	0,747
VLDL-C	-0,21 ± 0,24	-0,06 ± 0,18	0,086
ApoAI	+0,01 ± 0,10	+0,05 ± 0,12	0,186
ApoB	-0,30 ± 0,13	-0,29 ± 0,14	0,763

entre parentesis, número de indivíduos; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste *t de Student*, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução.

Ao avaliar a influência dos polimorfismos G2677T/A do gene *MDR1* sobre a resposta a atorvastatina, observou-se que os portadores do genótipo 2677GG apresentaram variações no perfil lipídico sérico similar as dos portadores dos demais genótipos (GT+GA+TT+TA) ($p>0,05$) (tabela 12). Além disso, resultados similares foram encontrados quando os indivíduos foram agrupados segundo a etnia (dados não mostrados). Portanto, o polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* não está associado com a resposta a atorvastatina em indivíduos hipercolesterolêmicos.

Tabela 12. Variação relativa na concentração dos lipídeos séricos (média±DP) após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária, agrupados segundo os genótipos do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1*.

Perfil Lipídico (mg/dL)	Polimorfismo G2677T/A		P*
	GG (n=28)	GT+TT+GA+TA (n=48)	
Colesterol total	-0,29 ± 0,10	-0,30 ± 0,10	0,584
Triacilgliceróis	-0,16 ± 0,23	-0,16 ± 0,23	0,824
HDL-C	+0,01 ± 0,10	+0,02 ± 0,12	0,269
LDL-C	-0,38 ± 0,15	-0,40 ± 0,11	0,662
VLDL-C	-0,16 ± 0,23	-0,17 ± 0,24	0,794
ApoA1	+0,05 ± 0,07	-0,00 ± 0,13	0,06
ApoB	-0,29 ± 0,14	-0,30 ± 0,13	0,661

entre parentesis, número de indivíduos; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoA1: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. *teste t de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

A análise da influência do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* sobre a resposta terapêutica mostrou que os indivíduos portadores do genótipo 3435CC tiveram variação do perfil lipídico sérico semelhante aos portadores dos genótipos CT e TT ($p>0,05$) (tabela 13), independente da etnia (dados não mostrados).

Ao separar os indivíduos de acordo com o sexo, observou-se que os homens portadores do alelo T (genótipos CT e TT) tiveram menor redução relativa de LDL-C sérica após o tratamento com atorvastatina que os portadores do genótipo CC, porém as reduções não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($-0,34 \pm 0,13$ vs $-0,43 \pm 0,010$; $p=0,103$). Por outro lado, nas mulheres as reduções relativas séricas dos lipídeos após administração de atorvastatina não foram associadas aos genótipos deste polimorfismo (figura 17; tabela 23 e 24, Anexo 6).

Tabela 13. Variação relativa na concentração dos lipídeos séricos (média \pm DP) após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária agrupados segundo os genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Perfil Lipídico (mg/dL)	Polimorfismo C3435T		P*
	CC (25)	CT+TT (51)	
Colesterol Total	-0,30 \pm 0,12	-0,30 \pm 0,09	0,937
Triacilgliceróis	-0,17 \pm 0,22	-0,15 \pm 0,24	0,695
HDL-C	+0,00 \pm 0,14	-0,01 \pm 0,10	0,572
LDL-C	-0,40 \pm 0,14	-0,39 \pm 0,12	0,773
VLDL-C	-0,18 \pm 0,21	-0,16 \pm 0,24	0,792
ApoAI	+0,01 \pm 0,13	+0,02 \pm 0,10	0,792
ApoB	-0,32 \pm 0,13	-0,28 \pm 0,13	0,246

entre parentesis, número de indivíduos; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

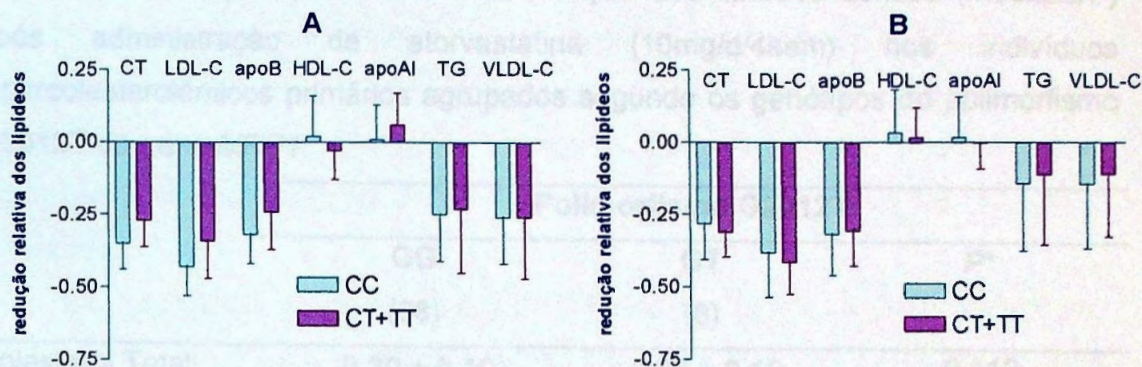


Figura 17. Redução relativa dos lipídeos e apolipoproteínas séricos nos pacientes hipercolesterolêmicos do sexo masculino (A) e feminino (B) após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem). CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da LDL; TG: triacilgliceróis; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apo AI: apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B.

Ao analisar a influência do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* sobre a resposta terapêutica, não foram observadas diferenças entre as variações de perfil lipídico sérico, após o tratamento com atorvastatina, entre os portadores de genótipo 2012GG e 2012GT (tabela 14). Para esse polimorfismo os pacientes não foram categorizados por etnia pois a distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos foi a mesma para brancos e negros.

Tabela 14. Variação relativa na concentração dos lipídeos séricos (média±DP) após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos hipercolesterolêmicos primários agrupados segundo os genótipos do polimorfismo G2012T do gene *MRP1*.

	Polimorfismo G2012T		
	GG (68)	GT (8)	P*
Colesterol Total	-0,30 ± 0,10	-0,25 ± 0,12	0,112
Triacilgliceróis	-0,17 ± 0,22	-0,10 ± 0,32	0,463
HDL-C	-0,02 ± 0,10	+0,07 ± 0,19	0,037
LDL-C	-0,40 ± 0,13	-0,34 ± 0,13	0,230
VLDL-C	-0,17 ± 0,22	-0,11 ± 0,31	0,432
ApoAI	+0,01 ± 0,10	+0,09 ± 0,19	1,000
ApoB	-0,30 ± 0,12	-0,21 ± 0,15	0,039

Número de indivíduos entre parentesis; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução; *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

4.5. Efeito dos polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1* e G2012T do gene *MRP1* sobre expressão gênica

A partir de 10 mL sangue coletado com EDTA, foram isoladas as células mononucleares do sangue periférico. Das amostras de sangue coletadas foram obtidas em média 9306±3488 células/mm³. A partir destas células foi obtido em média 716,10±224,90 µg de RNA total/mL, quantificado por espectrofotometria no UV em comprimento de onda 260nm. O grau de pureza, avaliado pela relação de absorvância entre os comprimentos de onda 260 nm/280 nm, aceito foi de 1,8 (Sambrook, 2001b).

Posteriormente, foi avaliada a integridade do RNA total após extração com Trizol^R, através de eletroforese em gel de agarose. A presença de uma ou de ambas frações ribossomais (18S/28S) garantiram a integridade do RNA total.

As reações de RT-PCR para avaliação da expressão gênica foram padronizadas utilizando-se reações individuais para cada gene. Posteriormente foram avaliadas as condições de RT-PCR *duplex* utilizando o gene *GAPDH* como constitutivo.

As condições avaliadas na RT-PCR-*duplex* foram: a temperatura de hibridação (56 a 62°C) e as concentrações dos conjuntos de iniciadores do gene em estudo (5 a 10 pmol) e do gene constitutivo (5 a 10 pmol).

Na **figura 18**, observa-se que, na temperatura de hibridização de 60°C, o sinal de amplificação foi mais intenso tanto para os genes de estudo (*MRD1*: linhas 1-3 e *MRP1*: linhas 5-7) quanto para o gene constitutivo (*GAPDH*). É importante observar que, nas RT-PCR *duplex* do gene *MDR1*, houve a formação de dímeros de oligonucleotídeos nas temperaturas de hibridização de 56 e 62°C (linhas 1 e 3).

Ao avaliar as concentrações dos iniciadores nas RT-PCR *duplex*, observou-se que o sinal de amplificação foi equivalente, quando foram utilizados 10 pmoles para os genes *MDR1* (**Figura 19A**) e *MRP1* (**Figura 19B**) e 5 pmol para o gene constitutivo (*GAPDH*). Nessas condições foi possível amplificar de forma reprodutível a expressão do RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1* por RT-PCR *duplex* em células mononucleares periféricas de pacientes hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina.

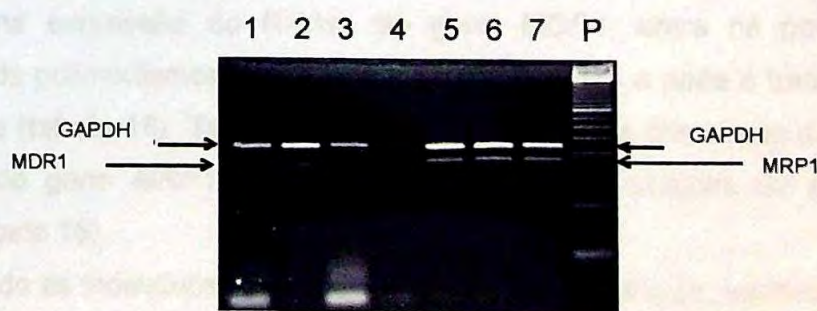


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de RT-PCR *duplex* dos genes *MDR1* (linhas 1-3) e *MRP1* (linhas 5-7). Linhas 1 a 3: temperatura de hibridização de 56°, 60° e 62°, respectivamente.

62°C, respectivamente. Linhas 5 a 7: temperatura de hibridização de 56°, 60° e 62°C, respectivamente. Linha 4: controle de reagentes. Linha P: padrão de tamanho molecular de DNA (100 bp).

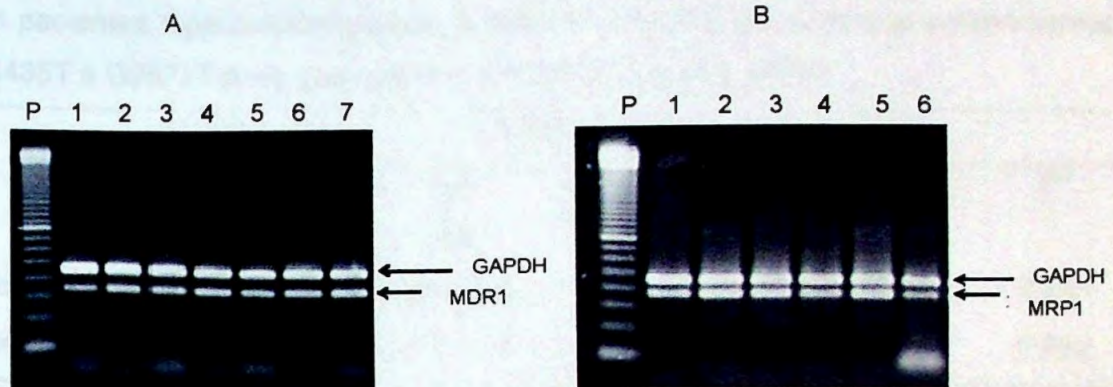


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de RT-PCR *duplex* dos genes *MDR1* (A) e *MRP1* (B). Ensaio de RT-PCR duplex: 10 pmoles de iniciadores *MDR1* ou *MRP1* e 5 pmoles de iniciadores *GAPD*, por 30 ciclos, temperatura de hibridização de 60°C. Linha P: padrão de tamanho molecular de DNA (100 bp). Linhas 1, 3, 5 e 7: expressão gênica basal. Linhas 2, 4 e 6: expressão gênica após tratamento com atorvastatina (10 mg/d/4sem).

Para avaliar se os polimorfismos dos genes *MDR1* e *MRP1* estão associados com diferenças na expressão gênica, antes e após o tratamento com atorvastatina, os pacientes foram agrupados de acordo com os genótipos previamente descritos.

De acordo com os dados descritos na **tabela 15**, não foram observadas diferenças na expressão do RNAm do gene *MDR1*, entre os portadores de genótipos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T, antes e após o tratamento com atorvastatina (**tabela 15**). Também não foram observadas diferenças de expressão do RNAm do gene *MRP1* entre os portadores de genótipos do polimorfismo G2012T (**tabela 15**).

Quando os indivíduos foram separados por grupo étnico, verificou-se que os portadores do alelo 3435C de etnia branca apresentaram maior expressão basal de RNAm do *MDR1* do que os portadores de alelo 3435T ($p < 0,05$) (**figura 20**; **tabela 25**, **anexo 7**). Nos pacientes de etnia negra não houve diferenças na expressão

basal ou após a administração de atorvastatina quando agrupados segundo os genótipos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T.

Tabela 15. Expressão basal e após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) em pacientes hipercolesterlêmicos primários segundo genótipo dos polimorfismos C3435T e G2677T/A do gene *MDR1* e G2012T do gene *MRP1*.

	G2677T/A		P*
	GG (28)	GT+TT+GA+TA (48)	
basal	0,58 ± 0,20	0,60 ± 0,21	0,763
atorvastatina	0,55 ± 0,22	0,55 ± 0,18	0,982
	C3435T		P*
	CC (25)	CT+TT (51)	
basal	0,66 ± 0,22	0,56 ± 0,19	0,049
atorvastastina	0,55 ± 0,21	0,55 ± 0,19	0,931
	G2012T		P*
	GG (68)	GT (8)	
Basal	0,73 ± 0,20	0,68 ± 0,16	0,566
atorvastatina	0,76 ± 0,18	0,66 ± 0,20	0,114

n: entre parêntesis; *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

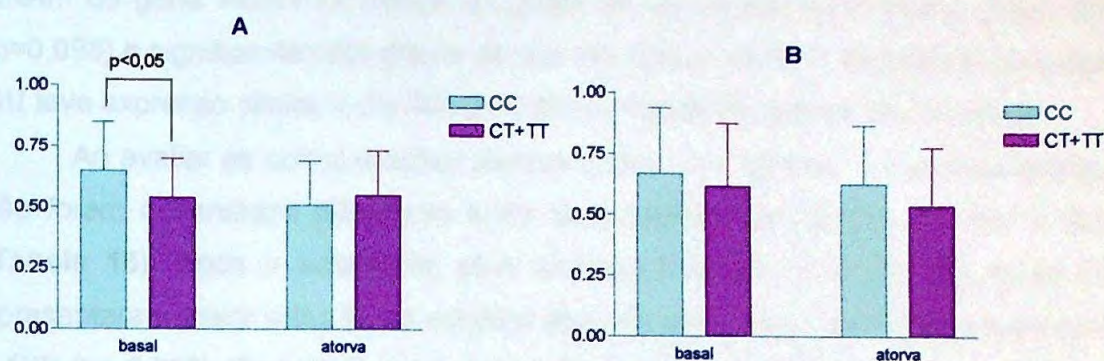


Figura 20. Expressão do mRNA do gene *MDR1*, basal e após a administração de atorvastatina (10 mg/d/4sem), entre portadores dos genótipos do polimorfismo *MDR1* C3435T de etnia branca (A) e negra (B).

4.6. Efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1*

O efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1* foi avaliado em CMSP de 76 pacientes hipercolesterolêmicos após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) em relação ao valor de expressão basal. Foram observados três padrões de variação da expressão gênica após o tratamento com atorvastatina. Os pacientes do grupo I apresentaram diminuição da expressão, os do grupo II não apresentaram alteração da expressão e os do grupo III apresentaram aumento da expressão (**Figura 21; tabela 26, anexo 8**).

Adicionalmente, foi avaliado o efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm do gene *MDR1* segundo os grupos étnicos. Não foram observadas diferenças de expressão basal ($p=0,175$), após a administração de atorvastatina ($p=0,440$) e de variação de expressão do RNAm ($p=0,247$) entre indivíduos de etnia branca e negra (**tabela 27, anexo 9**).

Ao analisar a expressão relativa do RNAm do gene *MDR1* em células mononucleares do sangue periférico, verificou-se que os indivíduos do grupo GI tinham maior expressão basal que os dos grupos GII ($p=0,078$) e GIII ($p<0,001$) (**Figura 22; tabela 26, anexo 8**). A expressão basal do grupo GII foi similar a do GIII ($p=0,160$). Após o tratamento com atorvastatina, a expressão relativa do

RNA_m do gene *MDR1* foi menor no grupo GI em comparação com o grupo GII ($p=0,098$) e significativamente menor do que em GIII ($p < 0,001$), enquanto que grupo GII teve expressão similar a do GIII ($p=0,337$) (**Figura 22; tabela 26, anexo 8**).

Ao avaliar as concentrações séricas basais dos lipídeos e apolipoproteínas, não foram observadas diferenças entre os pacientes dos grupos GI, GII e GIII (**Tabela 16**). Após o tratamento com atorvastatina, os indivíduos do grupo GI apresentaram maior redução na concentração de apoB sérica em comparação com o GIII ($p= 0,025$). Os indivíduos do grupo GI também apresentaram maior redução de colesterol total e LDL-C, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes (**Figura 23; tabela 28, anexo 10**).

Ao analisar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1* entre os indivíduos desses grupos, foi observada maior frequência do genótipo 3435CC no grupo GI (60%) que nos grupos GII (4%) e GIII (36%) (**Tabela 17**). Por outro lado, não houve diferença na distribuição do genótipo 2677GG entre os três grupos.

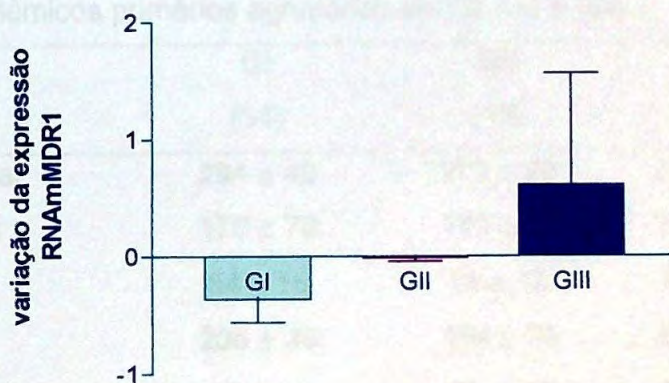


Figura 21. Variação (média±DP) da expressão do RNA_m do gene *MDR1* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos, após tratamento com atorvastatina (10 mg/d/4sem). GI: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNA_m; GII: pacientes que não apresentaram variação da expressão do RNA_m; GIII: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNA_m.

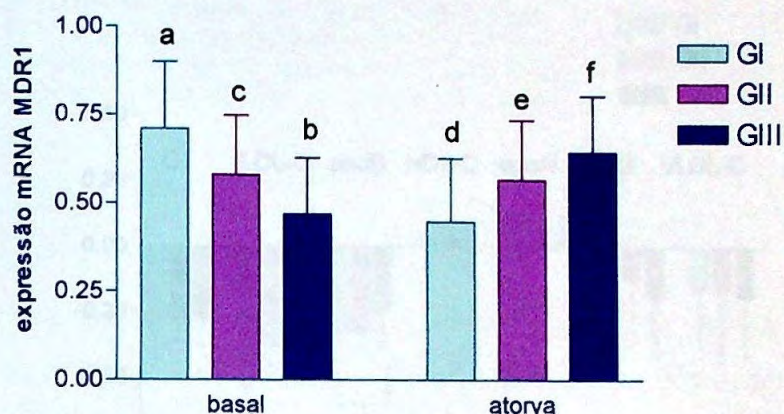


Figura 22. Comparações entre a expressão relativa basal e após administração de atorvastatina (10 mg/d/4sem) do RNAm do gene *MDR1* em células mononucleares do sangue periférico de pacientes hipercolesterolêmicos em GI, GII e GIII. GI: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNAm; GII: pacientes que não apresentaram modificação da expressão do RNAm; GIII: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNAm. $a \neq b$, $a = c$, $b = c$, $d \neq f$, $d = e$, $e = f$, $p < 0,05$, ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Tabela 16. Concentração dos lipídeos séricos (média±DP) basais nos indivíduos hipercolesterolêmicos primários agrupados em GI, GII e GIII.

	GI (34)	GII (12)	GIII (30)	<i>P</i> *
Colesterol Total	294 ± 40	272 ± 28	290 ± 47	0,294
Triacilgliceróis	170 ± 70	143 ± 62	179 ± 76	0,341
HDL-C	54 ± 16	59 ± 12	52 ± 15	0,306
LDL-C	206 ± 36	184 ± 23	202 ± 44	0,198
VLDL-C	34 ± 14	29 ± 12	36 ± 15	0,339
ApoAI	123 ± 22	127 ± 12	125 ± 26	0,828
ApoB	145 ± 19	137 ± 17	139 ± 22	0,309

Entre parentesis número de indivíduos; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução; GI: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNAm; GII: pacientes que não apresentaram modificação da expressão do RNAm; GIII: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNAm * ANOVA, os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

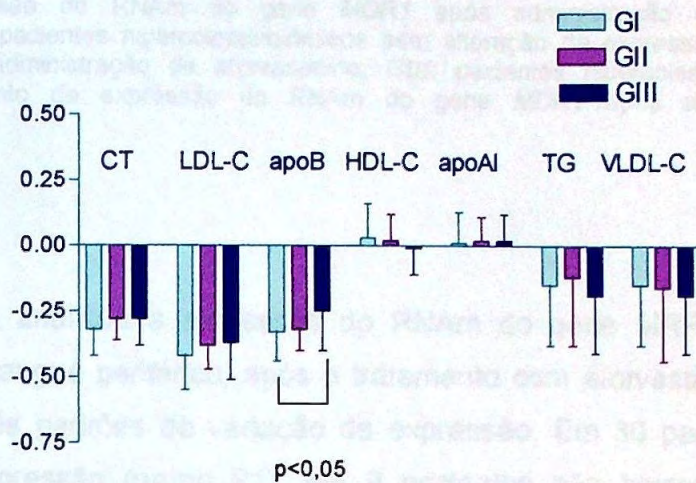


Figura 23. Variação relativa na concentração de lipídeos e apolipoproteínas séricos após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos pacientes hipercolesterolêmicos nos grupos GI, GII e GIII do gene *MDR1*. GI: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNAm; GII: pacientes que não apresentaram modificação da expressão do RNAm; GIII: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNAm. *ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Tabela 17. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T do gene *MDR1* em pacientes hipercolesterolêmicos dos grupos I, II e III.

C3435T	GI	GII	GIII
CC	60 % (15)	4 % (1)	36 % (9)
CT+TT	37 % (19)	22 % (11)	41 % (21)
$\chi^2 = 5,33; 2 \text{ gl}; P = 0,069$			
G2677T/A	GI	GII	GIII
GG	43 % (12)	18 % (5)	39 % (11)
GT+GA+TT+TA	46 % (22)	14 % (7)	40 % (19)
$\chi^2 = 0,155; 2 \text{ gl}; P = 0,925$			

Número de indivíduos entre parêntesis; GI: Pacientes hipercolesterolêmicos que apresentaram redução da expressão do RNAm do gene *MDR1* após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem); GII: pacientes hipercolesterolêmicos sem alteração da expressão do RNAm do gene *MDR1* após administração de atorvastatina; GIII: pacientes hipercolesterolêmicos que apresentaram aumento da expressão do RNAm do gene *MDR1* após administração de atorvastatina.

Quando se analisou a expressão do RNAm do gene *MRP1* em células monocleares do sangue periférico, após o tratamento com atorvastatina, também se observaram três padrões de variação da expressão. Em 30 pacientes houve diminuição da expressão (grupo P1), em 9 pacientes não houve variação da expressão (grupo P2) e em 37 pacientes ocorreu aumento da expressão (grupo P3) (Figura 24; tabela 29, anexo 11).

Ao analisar a expressão do gene *MRP1* em CMSP foi observado que nos grupos P1 e P2 a expressão basal foi maior que no grupo P3 ($p < 0,05$) (Figura 25; tabela 29, anexo 11). Após o tratamento com atorvastatina, a expressão dos indivíduos do grupo P1 foi menor do grupo P3 ($p = 0,01$) e não foi diferente do grupo P2 ($p = 0,06$). Os grupos P2 e P3 não apresentaram diferenças ($p = 0,936$)

Ao avaliar as concentrações séricas basais dos lipídeos e apolipoproteínas e a resposta terapêutica não foram observadas diferenças entre os pacientes dos grupos P1, P2 e P3 do gene *MRP1* (Tabela 18). Após tratamento com atorvastatina, os indivíduos dos grupos P1, P2 e P3 não apresentaram diferenças na redução dos lipídeos séricos (figura 26; tabela 30, anexo 12)

De acordo com os dados da tabela 19, podemos observar que a distribuição dos genótipos do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* foi similar entre os grupos P1, P2 e P3.

Tabella 18. Correlazione

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

ipercolesterolemia

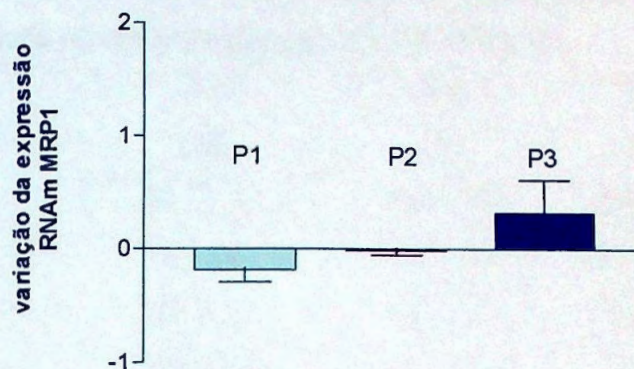


Figura 24. Variação (média±DP) da expressão do RNAm do gene *MRP1* em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos hipercolesterolêmicos, após tratamento com atorvasatatina (10 mg/d/4sem). P1: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNAm do gene *MRP1*; P2: pacientes que não apresentaram variação da expressão do RNAm do gene *MRP1*; P3: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNAm do gene *MRP1*.

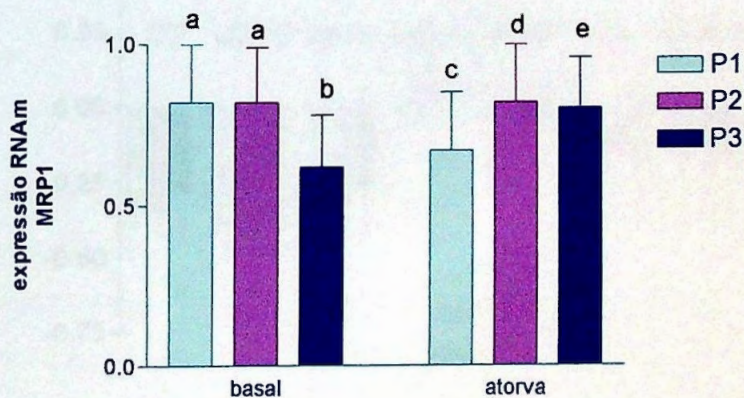


Figura 25. Comparações entre a expressão relativa basal e após administração de atorvastatina (10 mg/d/4sem) do gene *MRP1*. P1: pacientes que apresentaram redução da expressão do RNAm do gene *MRP1*; P2: pacientes que não apresentaram variação da expressão do RNAm do gene *MRP1*; P3: pacientes que apresentaram aumento da expressão do RNAm do gene *MRP1*. a≠b, c≠d, c≠e; d=e, p<0,05, ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Tabela 18. Concentração dos lipídeos séricos (média±DP) basais nos indivíduos hipercolesterolêmicos primários agrupados em P1, P2I e P3.

	P1 (30)	P2 (9)	P3 (37)	P*
Colesterol Total	287 ± 35	296 ± 61	288 ± 42	0,862
Triacilgliceróis	162 ± 71	149 ± 45	180 ± 77	0,425
HDL-C	55 ± 15	50 ± 13	55 ± 16	0,621
LDL-C	200 ± 30	217 ± 53	198 ± 40	0,453
VLDL-C	32 ± 14	30 ± 9	36 ± 15	0,414
ApoAI	126 ± 24	118 ± 17	125 ± 22	0,646
ApoB	144 ± 19	146 ± 26	138 ± 19	0,378

Entre parentesis número de indivíduos; LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; TG: triacilgliceróis; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução; * ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas..

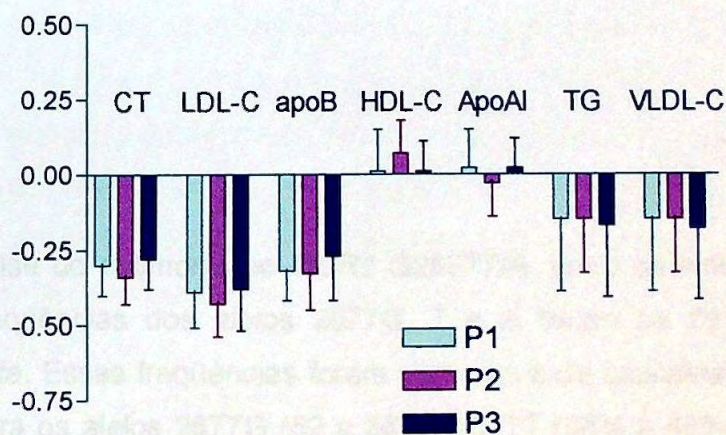


Figura 26. Variação relativa na concentração de lipídeos e apolipoproteínas séricas após a administração de atorvastatina (10 mg/d/4sem) dos pacientes hipercolesterolêmicos dos grupos P1, P2 e P3. ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Tabela 19. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos G2012T do gene *MRP1* em pacientes hipercolesterolêmicos dos grupos P1, P2 e P3.

Genótipos	P1	P2	P3
GG	38 (26)	13 (9)	49 (33)
GT	50 (4)	0 (0)	50 (4)

$\chi^2 = 1,313$; 2 gl; $P = 0,519$

Número de indivíduos entre parêntesis; P1: pacientes hipercolesterolêmicos que apresentaram redução da expressão do RNAm do gene *MRP1* após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem); P2: pacientes hipercolesterolêmicos sem alteração da expressão do RNAm do gene *MRP1* após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem); P3: pacientes hipercolesterolêmicos que apresentaram aumento da expressão do RNAm do gene *MRP1* após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem)

5. Discussão

Na análise do polimorfismo *MDR1* G2677T/A, entre os indivíduos de etnia branca, as freqüências dos alelos 2677G, T e A foram de 59%, 36% e 5%, respectivamente. Essas freqüências foram similares a de caucasianos americanos e europeus para os alelos 2677G (52 a 56%), 2677T (38% a 46%) e 2677A (2%) (Kim *et al.*, 2001; Cascorbi *et al.*, 2001, Gerloff *et al.*, 2002).

Já, entre os indivíduos de etnia negra, as freqüências encontradas para os alelos 2677G (68%) e 2677T (27%) foram similares às observadas em indivíduos de etnia negra de origem americana observada por Kim e cols. (alelo G: 85%; alelo T: 15%) (Kim *et al.*, 2001). Entretanto, o alelo 2677A que ocorreu em 5% dos indivíduos de etnia negra do nosso estudo, não foi detectado no estudo de Kim e cols. e também não foi avaliado em outras populações negras (Kim *et al.*, 2001).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatisticamente significantes de frequência dos alelos do polimorfismo G2677T/A entre os indivíduos de etnias branca e negra, nota-se que o alelo T foi discretamente mais freqüente nos de etnia branca. Essa diferença se acentuou na distribuição dos genótipos, sendo a frequência do genótipo GT nos indivíduos de etnia branca (50%) significativamente maior que nos de etnia negra (27%).

Em relação ao polimorfismo *MDR1* C3435T, a frequência alelo 3435T nos indivíduos de etnia negra (39%) foi similar às observadas em populações negras de origem africana (10% a 27%) (Kim *et al.*, 2001; Schaeffeller *et al.*, 2001; Ameyaw *et al.*, 2001).

Já entre os pacientes de etnia branca, o alelo 3435T apresentou frequência de 44%, também semelhante à encontrada em caucasianos de origem européia (48% a 54%) (Hoffmeyer *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Ameyaw *et al.*, 2001; Cascorbi *et al.*, 2001).

Para o polimorfismo C3435T, não foram observadas diferenças na frequência de alelos e na distribuição dos genótipos entre os dois grupos étnicos. Entretanto, a frequência do genótipo CT foi discretamente maior nos indivíduos de etnia branca (52%) que nos de etnia negra (41%). Segundo Ameyaw e cols., a frequência do genótipo CT é maior (38 a 48%) em indivíduos Caucassianos da Europa e da Ásia, enquanto que, em populações Africanas e Afro-americanas, o genótipo CC é o mais frequente (52 a 70%) (Ameyaw *et al.*, 2001).

As diferenças na distribuição dos genótipos e na frequência dos alelos dos polimorfismos G2677T/A e C3435T, entre as etnias dos pacientes estudados, revelam a importância desse parâmetro para a análise dos resultados.

O polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1* não apresentou efeito sobre as concentrações de lipídeos séricos, antes e após a administração de atorvastatina, independente da etnia ou do sexo dos indivíduos hipercolesterolêmicos estudados.

Ao analisar o efeito do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* sobre o perfil lipídico sérico basal, foram observados maiores valores de apo AI sérica em indivíduos portadores do alelo 3435T (genótipo CT+TT) quando comparados aos portadores do genótipo 3435CC, nos pacientes de etnia negra.

Curiosamente, a expressão basal do RNAm do gene *MDR1* nas células mononucleares do sangue periférico foi menor nos portadores do alelo 3435T (genótipo CT+TT) que nos com genótipo 3435CC, nos pacientes de etnia branca. Associação entre o genótipo 3435TT e menor expressão do RNAm do gene *MDR1* em linfócitos e em enterócitos foi também observada em indivíduos caucasianos saudáveis (Hofmeyer *et al.*, 2000; Hitzl *et al.*, 2001).

Foi sugerido que a proteína GPP, codificada pelo gene *MDR1*, está envolvida no transporte do colesterol da membrana celular para o citoplasma e para o retículo endoplasmático, onde é esterificado pela ACAT e armazenado (Garrigues, *et al.*, 2002; Bateta *et al.*, 1999). Portanto, a baixa expressão do RNAm do *MDR1*, e conseqüentemente de GPP, poderia resultar na redução da taxa de transporte intracelular do colesterol e de seu armazenamento na forma esterificada. Em decorrência disso, haveria um acúmulo de colesterol da membrana que resultaria no aumento da taxa de transporte reverso do colesterol mediado pela HDL, lipoproteína rica em apo AI (Bateta *et al.*, 2003).

É possível, portanto, que a maior concentração basal de apo AI sérica resulte da baixa expressão do gene *MDR1* observada nos portadores do alelo 3435T (CT+TT).

A proteína GPP regula a metabolização hepática da atorvastatina através da eliminação dos produtos de biotransformação (Lennernas, 2003). Essa proteína também é expressa em outros tecidos e órgãos com função protetora celular à exposição aos xenobióticos (Marzolini *et al.*, 2004).

É importante observar que a expressão do RNAm deste estudo foi realizada em células mononucleares do sangue periférico, e portanto, células que não apresentam função de metabolização de xenobióticos, mas que expressam proteínas de efluxo em suas membranas, com funções de proteção celular a agentes tóxicos.

Em linfócitos (CD56+, células *NK*) de indivíduos caucasianos saudáveis, Hitzl e cols. encontraram associação do genótipo 3435TT com menor atividade de efluxo da rodamina pela GPP e menor expressão do RNAm do gene *MDR1* (Hitzl *et al.*, 2001). Já em enterócitos de indivíduos saudáveis caucasianos portadores do genótipo 3435TT, Hoffmeyer e cols. demonstraram associação entre a menor expressão do

RNA_m do gene *MDR1* a maior concentração sérica de digoxina administrada por via oral (Hofmeyer *et al.*, 2000). Por outro lado, Sakaeda e cols., observaram em indivíduos sadios japoneses, maior expressão do RNA_m em enterócitos de portadores do genótipo 3435TT, associada a elevada expressão do RNA_m do gene *CYP3A4* (Nakamura *et al.*, 2002, Sakaeda *et al.*, 2002). Portanto, a taxa de expressão do RNA_m do gene *MDR1* parece depender do grupo étnico estudado.

A menor expressão RNA_m do gene *MDR1*, em células mononucleares do sangue periférico, encontrada em indivíduos portadores do alelo 3435T (CT+TT) parece estar associada com menor atividade da proteína GPP, como observado em linfócitos CD56+ e em biopsias de duodeno (Hitzl *et al.*, 2001; Hoffmayer *et al.*, 2000).

Hoffmayer e cols. (2000) observaram que a concentração plasmática de digoxina é maior em portadores do alelo 3435T, devido a maior absorção intestinal e menor eliminação hepática do fármaco.

Kajinami e cols. mostraram que o polimorfismo C3435T tem influência na resposta terapêutica a atorvastatina dependente do sexo, sendo que as portadoras do alelo T apresentam maiores reduções dos lipídeos séricos em relação às portadoras do alelo C (Kajinami *et al.*, 2004b).

Em contraste, no nosso estudo, os pacientes do sexo masculino portadores do alelo 3435T (CT+TT) tiveram menor redução das concentrações séricas de apoB, colesterol total e LDL-C quando comparadas com as dos portadores do genótipo 3435CC, após o tratamento com atorvastatina.

Os resultados obtidos no nosso estudo, embora discrepantes dos obtidos por Kajinami e cols. (2004b), podem estar relacionados a diferenças na expressão do RNA_m do gene *MDR1*, basal e após o tratamento com atorvastatina, observadas nos indivíduos hipercolesterolêmicos.

Os indivíduos com maior expressão basal (GI) tiveram redução da expressão após o tratamento com atorvastatina. Em contraste, pacientes com menor expressão basal (GIII) tiveram aumento da expressão. Portanto, a atorvastatina apresenta importante efeito sobre a expressão do RNA_m do gene *MDR1* e esse efeito é dependente da expressão basal.

Os pacientes com menor expressão após o tratamento (GI) apresentaram maiores taxas de redução de colesterol total, LDL-C e apo B sérica que os do grupo GIII. Portanto, a redução da expressão do RNAm do gene *MDR1* deve estar associada com a diminuição da expressão da proteína e, conseqüentemente, com a menor atividade de efluxo da atorvastatina, aumentando sua eficácia terapêutica.

De maneira inversa, o grupo de pacientes que apresentou aumento da expressão do RNAm do gene *MDR1* após administração de atorvastatina (GIII), teve eficácia terapêutica menor, verificada pela menor redução das concentrações séricas de apoB, LDL-C e colesterol total. Cabe ressaltar que, no grupo GIII, o alelo 3435T (CT+TT) foi o mais freqüente (41%), enquanto que o genótipo 3435CC foi o mais freqüente no grupo GI (60%).

Esses resultados são sugestivos de que os indivíduos portadores do genótipo 3435CC apresentam melhor resposta terapêutica que é dependente da redução da expressão do RNAm do gene *MDR1* e que provavelmente resulta da maior concentração intracelular da atorvastatina. Por outro lado, nos portadores do alelo 3435T (CT+TT), o aumento da expressão do gene *MDR1* após o tratamento provavelmente contribui para a menor concentração intracelular de atorvastatina que resulta na menor resposta terapêutica observada nos pacientes do sexo masculino.

As variações na expressão do RNAm do gene *MDR1* observadas neste estudo podem também resultar de mecanismos de regulação da expressão gênica. Uma das vias de regulação da expressão do gene *MDR1* se dá por interação da região promotora do gene com fatores de transcrição do tipo receptores nucleares, em especial o receptor X pregnana (PXR) (Honkakoski et al., 2003; Geick et al., 2001).

Os PXR, também denominados receptores nucleares órfãos, apresentam domínio de ligação a xenobióticos e são ativados quando formam heterodímeros com outro receptor nuclear, o receptor X retinóide (RXR) (Chawla et al., 2001). Esses heterodímeros, quando associados a diferentes xenobióticos, ativam a transcrição de genes envolvidos na metabolização (enzimas de fases I e II) e eliminação (transportadores da família ABC) de xenobióticos, protegendo, assim, as células de ações tóxicas a substâncias que tenham sido expostas (Kliwer et

al., 2002). Já foi descrito que vastatinas podem ser ligantes desses receptores nucleares (Honkakoski *et al.*, 2003).

Nos pacientes cuja expressão basal dos genes de efluxo foi maior (GI), possivelmente a concentração intracelular da atorvastatina durante o tratamento foi menor e portanto, haveria menor ativação do heterodímero PXR-RXR e consequentemente menor expressão do gene *MDR1*. Adicionalmente, foi descrito por Boyd e cols. que a atorvastatina apresenta efeito inibitório sobre a GPP (Boyd *et al.*, 2000) apresentando, assim, efeito sinérgico na redução da expressão do gene. Por outro lado, naqueles pacientes cuja expressão basal dos genes de efluxo foi menor (GIII), a concentração intracelular de atorvastatina foi maior gerando maior ativação dos receptores nucleares que modulam a expressão de vários genes, aumentando a expressão do gene *MDR1*.

Quanto ao polimorfismo G2012T do gene *MRP1*, a frequência do alelo 2012T em indivíduos de etnia branca (5%) foi similar à observada por Conrad e cols. (2001), em caucasianos alemães (2,8%). O alelo 2012T foi observado pela primeira vez em indivíduos de etnia negra (6%) do nosso estudo. Devido as baixas frequências do alelo 2012T, não foram observadas diferenças de frequência dos alelos e de distribuição dos genótipos do polimorfismo G2012T entre indivíduos de etnia negra e branca.

A falta de variação do perfil lipídico sérico, antes e após o tratamento com atorvastatina, entre os portadores dos genótipos do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* sugere que este polimorfismo não influencia nos lipídeos e apolipoproteínas séricos e na resposta a atorvastatina.

Apesar do polimorfismo G2012T do gene *MRP1* ser responsável por troca de aminoácido no sítio de ligação ao ATP na proteína (Gli671Val), a eliminação dos produtos de biotransformação da atorvastatina pela via renal mediada pela *MRP1*, parece não sofrer efeito dessa variante. Entretanto, devido à baixa frequência do alelo 2012T estudos com número maior de indivíduos devem ser realizados para confirmar ou não os achados deste trabalho.

Como foi observado para o gene *MDR1*, após a administração de atorvastatina, houve variabilidade na expressão do RNAm do gene *MRP1* entre os pacientes estudados. Essa variabilidade parece depender da expressão basal do

gene *MRP1*. Entretanto, as variações de expressão do gene *MRP1* não ocorreram nos mesmos pacientes que as observadas para o gene *MDR1*. Esse resultado se justifica pela diferença de regulação da expressão dos genes *MDR1* e *MRP1*. Os genes *MDR1* e *MRP1* apresentam em comum apenas uma via de regulação, a via Sp1 (Scotto, 2003).

6. Conclusões:

6.1. O alelo 3435T em pacientes hipercolesterolêmicos está associado à menor expressão basal do RNAm do gene *MDR1* em células mononucleares periféricas nos indivíduos de etnia branca e à maior concentração basal de apolipoproteína AI sérica nos indivíduos de etnia negra.

6.2. Os polimorfismos G2677T/A do gene *MDR1* e G2012T do gene *MRP1* não parecem associados a variações do perfil lipídico sérico, antes e após o tratamento com atorvastatina.

6.3. A atorvastatina exerceu efeito sobre a expressão do RNAm dos genes *MDR1* e *MRP1* de maneira dependente da expressão basal.

6.4. A redução da expressão do RNAm do gene *MDR1*, após administração da atorvastatina, foi associada com maior redução de apolipoproteína B sérica.

7. Referências bibliográficas

- 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**, Washington, v.77, p.3957-3961, 1980.
- AMBROSI, P; VILLANI, P; HABIB, G; BOUVENOT, G. The statins: new properties. **Therapie**, Paris, v.58, n.1, p.15-21, 2003.
- AMEYAW, M.A.; REGATERIO, F.; LI, T.; LIU, X.; TARIQ, M.; MOBAREK, A.; THORTON, N.; FOLAYAN, G.O; GITHANG, J.; INDALO, A.; OFORI-ADJEI, D.; PRICE-EVANS, D.A.; MCLEOD, H.L. *MDR1* pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. **Pharmacogenetics**, London, v.11, p. 217-21, 2001.
- AMBUDKAR, S., DEY, S., HRYCYNA, C. A., RAMACHANDRA, M., PASTAN, I., GOTTESMAN, M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v.39, p. 361-398, 1999.
- ANDERSON, K.M., CASTTELLI, W.P., LEVY, D. Cholesterol and mortality 30 years of follow-up from the Framingham Study. **JAMA**, Chicago, v.257, p. 2176-80, 1987.
- BABSON, A.L. The IMMULITE Automated Immunoassay System. **J Clin Immunoassay**, v.14, p.83-8, 1991.
- BATETTA, B; DESSI S., PUTZOLU, M. SANNA, F., SPANNO, O., MULAS, M.F., PETRUZZO, P., CAPPALÀ, A., BROTTU, G. *MDR1* gene expression in normal and atherosclerotic human arteries. **J Vasc Res**, Basel, v. 36, p. 261-271, 1999.
- BATETTA, B; DESSI S., MULAS, M; F SANNA, F; PUTZOLU, M., BONATESTA, RR; GASPERI-CAMPANI, A; RONCUZZI, L., BAIOCCHI, D; DESSI, S. Role of cholesterol Ester pathway in the control of cellcycle in human aortic smooth muscle cells. **FASEB J**, Bethesda, v.17, p.746-8, 2003.
- BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weiberg. In: **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.179-202, 1995.

- BERNAL, ML; SINUES, B; FANLO, A; MAYAYO, E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monitoring*, Philadelphia, v. 25, p. 107-111, 2003.
- BONOW, R.O.; SMAHA, LS.; SMITH, S.C.; MENSAH, G.A.; LENFANT, C. World Health Day 2002. The International Burden of Cardiovascular Disease: Responding to Emerging Global Epidemic. *Circulation*, Dallas, v.106, p.1602-5, 2002.
- BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 1461, p. 347-57, 1999.
- BORST P, ELFERINK RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, Palo Alto, v. 71, p. 537-92, 2002.
- BOYD, RA; STERN, RH; STEWART, BH; Atorvastatin coadministration may increase digoxin concentrations by inhibition of intestinal P-glycoprotein-mediated secretion. *J Clin Pharmacol*, Berlin, v. 40, p. 91-8, 2000.
- BRINCKMANN, U.; EICHELBAUM, M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene *MDR1*. *Pharmacogenomics J*, Avenet, v.1, p.59-64, 2001.
- BRORHOLT-PETERSEN, J.U.; JENSEN, H.K.; RAUNGAARD, B.; GREGERSEN, N.; FAEGERMAN, O. LDL-receptor gene mutations and the hypercholesterolemic response to statin therapy. *Clin Genet*, Copenhagen, v. 59, p. 397-405, 2001.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, Bristol, v.25, p.169-93, 2000.
- CASCORBI, I.; GERLOFF, T.; JOHNE, A.; MEISEL,C.; HOFFMEYER,S.; SCWAB, M.; SCHAEFFELER, E.; EICHELBAUM, M.; BRINKMANN, U.; ROOTS, I. Frequency of single nucleotide polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, St. Louis, v.69, p.169-74, 2001.
- CASTELLI, W.P. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham Study. *Am J Med*, New York, v.76, n.2SA, p.4-12, 1984.
- CAVALLI, S.A., HIRATA, M.H., SALAZAR, L.A., DIAMENT, J., FORTI, N., GIANNINI, S.D., NAKANDAKARE, E.R., BERTOLAMI, M.C., HIRATA, R.D.C. 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.

- CAVALLI, S.A. **Estudo de alterações no gene da enzima CYP3A4 que influenciam a resposta à atorvastatina em indivíduos hipercolesterolêmicos.** São Paulo, 2003. 103 p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – SP)
- CHAWLA, A.; REPA, J.J.; EVANS, R.M.; MANGELSDORF, D.J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, Washington, v. 294, v.1866-70, 2001.
- CHRISTIANS, U.; JACOBSEN, W.; FLOREN, L.C. Metabolism and drug interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: Are the statins mechanistically similar? **Pharmacol Ther**, Oxford Elmsford, v.80, n.1, p.1-34, 1998.
- CHOWBAY, B; CUMARASWAMY, S; CHEUNG, YB; ZHOU, Q; LEE, EJD. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporine disposition in heart transplant recipients. **Pharmacogenetics**, London, v. 13, p. 89-95, 2003.
- COLE, S.P.C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.V.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. **Science**, Washington, v. 258; p.1650-4, 1992.
- CONRAD, S; KAUFFMANN, H-M; ITO, K-I; DEELEY, RG; COLE, SP; SCHRENK, D. Identification of human multidrug resistance protein 1 (*MRP1*) mutations and characterization of a G671V substitution. **J Hum Genet**, Tokyo, v.46, p.656-63, 2001.
- CORSINI, A., BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol Ther**, Oxford Elmsford, v. 84, p.413-28, 1999.
- COUTURE, P. OTIVOS, JD., CUPPLES, LA., WILSON, PW., SCHAEFFER, EJ., ORDOVAS, JM. Association of the A204C polymorphism in the cholesterol 7- α -hidroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring study. **J Lip Res**, New York, v.40, p.1883-9, 1999.
- DAVIDSON, MH. Newer Pharmaceutical Agents to treat lipid disorders. **Curr Cardiol Rep**, Philadelphia, v.5, n.6, p.463-9, 2003.
- DAVIDSON, M; MA, P; STEIN,EA, *et al.* Comparison of effects of low-density-lipoprotein cholesterol and high-density-lipoprotein cholesterol with rosuvastatin versus atorvastatin in patients with Type IIa or IIb hypercholesterolaemia . **Am J Cardiol**, New York, v.89, p.268-75, 2002.

- DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, N.Y., v.11, n.7, p.1156-66, 2001.
- 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]
- DORNBROOK-LAVENDER, K. A.; PIEPER, J.A. Genetic Polymorphisms in emerging cardiovascular risk factors and response to statin therapy. **Cardiovasc Drugs Ther**, Norwell, v. 17, p. 75-82, 2003.
- EFFERTH T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Méd*, Boca Raton, v. 1, n.1, p. 45-65, 2001
- FIELD, F.J., BORN, E., MURTHY,S., MATHUR, S.N. Transport of cholesterol from the endoplasmatic reticulum to the plasma membrane is constitutive in CaCo-2 cells and differs from the transport of plasma membrane cholesterol to the endoplasmatic reticulum. **J Lipid Res**, New York, v.39, p.333-43, 1998.
- FORTI, N.; SLALZAR, L.A.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos brasileiros. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 80, n. 5, p. 565-71, 2003.
- FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, Washington, v. 18, p. 499-502,1972.
- FROMM, M.F.. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v. 54, p.1295-1310, 2002.
- FUENTES, MG; GONZALEZ-LAMUÑO, D; LOZANO, MJ. Condicionantes genéticos Del riesgo cardiovascular. **An Esp Pediatr**, Madrid, v.46, p. 3-7, 1997.
- GAO, M.; CUI, H.R.; KOE, D.W.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G. Comparison of functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 275, p.13098-13108, 2000.
- GARRIGUES, A; ESCARGUEIL, AE; ORLOWSKI, S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, Wahington, V. 99, N. 19, P. 10347-52, 2002

- GEICK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal *MDR1* by rifampin. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 276, n.18, 14581-7, 2001.
- GERDES, L.U.; GERDES, C.; KERVINEN, K.; *et al.*, The apolipoprotein $\epsilon 4$ allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction – a sub-study of the Scandinavian Simvastatin Survival Study. **Circulation**, Dallas, v. 101, p. 1366-71, 2001.
- GERLOFF, T; SCHAEFFER, M; JOHNR, A; OSELIN, K; MEISEL, C; CASCORBI, I, *et al.* *MDR1* genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. **Br J Clin Pharmacol**, London, v. 54, p. 610-6, 2002.
- GOLDSTEIN J.L.; BROWN, M.S. The cholesterol quartet. **Science**, Washington, v. 292, p.1310-2, 2001.
- GOLDSTEIN, J.L.; RAWSON, R.B.; BROWN, M.S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. **Arch Biochem Biophys**, Orlando, v. 397, n.2, p.139-48, 2002.
- GRANT, CE; KURZ, EU; COLE, SP; DEELEY, RG. Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (*MRP*) and alternative splicing of its mRNA. **Genomics**, San Diego, v. 45, p.368-78, 1997.
- GRUNDY, S.M. United States Cholesterol Guidelines 2001: Expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. **Am J Cardiol**, New York, v.88, p. 23J-27J, 2001.
- GUZMÁN, ECR; HIRATA, MH; QUINTÃO, ECR; HIRATA, RDC. Association of the lipoprotein B gene polymorphism with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v.38, p.731-6, 2000.
- HIPFNER, D.R.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, vol. 1461, p. 359-76, 1999.
- HITZL, M; DRESHER, S; VAN DER KUIP, H; SCHAEFFELER, E; FISCHER, J; SCWAB, M, *et al.* The C3435T mutation in the human *MDR1* gene is associated with altered efflux of the p-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. **Pharmacogenetics**, London, v. 11, p. 293-8, 2001.
- 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.1-15, 2001.

- HOFFMEYER,S.; BURK, O.; VON RICHTER, O.; ARNOLD, H.P.; BROCKMOLLER, J.; JOHNE, A.; CASCORBI, I.; GERLOFF, T.; ROOTS, I.; EICHELBAUM, M.; BRINKMANN, U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.97, n. 7, p. 3473-8, 2000.
- HONKAKOSKI, P; SUEYOSHI, T.; NEGISHI, M. Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. **Ann Med**, Helsinki, v. 35, p.172-82, 2003.
- HORDER, M.; ELSER, R.C.; GERHARDT, M. *et al*. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC Methos for Creatine Kinase. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, Berlin, v. 29, p. 435-56, 1991.
- IGLESIAS, P; DÍEZ, J J. New drugs for the treatment of hipercholesterolaemia. **Expert Opin Investig Drugs**, London, v.12, n. 8, p,1-12, 2003.
- ITO, S; IERI, I.; TANABE, M.; SUZUKI, A.; HIGUCHI, S.; OTSUBO, K. Polymorphism of the ABC transporter genes, *MDR1*, *MRP1* and *MRP2/cMOAT*, in healthy japanese subjects. **Pharmacogenetics**, London, v.11, p.175-84, 2001.
- JACOBSEN, W; KUHN, B; SOLDNER, A; KIRCHNER, G; SEWING, K-FR; KOLLMAN, PA; BENET, LZ; CHRISTIANS, U. Lactonization is the critical first step in disposition of the 3-hydroxy-3-methyglutaryl-coa reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab Disp**, Bethesda, v.28, n.11, p.1369-78, 2000.
- JACOBSON, T.A. Clinical context: Current concepts of coronary heart disease management. **Am J Med**, New York, v. 110, suppl. 6A, p. 3S-11S, 2001.
- JOHNE, A, KO"PKKE, K; GERLOFF, T; MAI, I; RIETBROCK, S; MEISEL, C;HOFFMEYER, S; KERB, R; FROMM, M.F; ULRICH BRINKMANN, U; EICHELBAUM, M; BROCKMO"LLER, J; CASCORBI, I; ROOTS, I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein *MDR1* gene. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 72, p. 584-84, 2002.
- KAJINAMI, K.; BROUSSEAU, M.E.; ORDOVAS, J.M. SCHAEFER, E.J. CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. **Am J Cardiol**, New York, v. 93, p.104-7, 2004a.
- KAJINAMI, K.; BROUSSEAU, M.E.; ORDOVAS, J.M. SCHAEFER, E.J. Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (*MDR1*) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. **Am J Cardiol**, New York v. 93, p.1046-50, 2004b.

- KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P., GORDON, T. Cholesterol in the prediction of the atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v.90, p.85-91, 1979.
- KARL, J.; ENGEL, W.D. Determination of apolipoprotein AI and B without sample dilution. Poster presented at the 57th Meeting of the European Atherosclerosis Society, Lisbon and the IX European Congress of Clinical Chemistry, Cracow, 1991.
- KARMEN, A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. **J Clin Invest**, New Haven, v.34, p.131, 1955.
- KASTELEIN, J. What future for combination therapies? **Int J Clin Pract Suppl**, Escher, v.134, p.45-50, 2003
- KERB, R.; HOFFMEYER, S.; BRINCKMANN, U. ABC drugs transporter: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in *MDR1*, *MRP1* and *MRP2*. **Pharmacogenomics**, London, v.2, n.1, p.51-64, 2001.
- KIM, R.B.; LEAKE, B.L.; CHOO, E.F.; DRESSER, G.K.; KUBBA, S.V.; SCHWARZ, U.I.; TAYLOR, A.; XIE, H.G.; MCKINSEY, J.; ZHOU, S.; LAN, B.L.; SCHUETZ, J.D.; SCUETZ, E.G.; WILKINSON, G.R. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and Africans Americans. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v.70, p.189-99, 2001.
- KLIEWER, S.A.; GOODWIN, B.; WILLSON, T.M. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. **Endocr Rev**, Baltimore, v.23, n. 5, p.687-702, 2002.
- LaROSA, J.C. Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. **Am J Cardiol**, New York, v.88, p.291-293, 2001.
- LENNERNÄS, H. Clinical Pharmacokinetics of Atorvastatin. **Clin Pharmacokinet**, New York, v. 42, n. 13, p.1141-60, 2003
- 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.
- LLORENTE V. E BADIMON L. Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica. **Rev Esp Cardiol**, Madrid, v.51, n.8, p.633-41, 1998.
- LIN, JL; YAMAZAKI, M. Role of P-glycoprotein in Pharmacokinetics. Clinical Implications. **Clin Pharmacokinet**, New York, v. 42, n. 1, p. 59-98, 2003.

- MACHADO, M.O., HIRATA, M.H., BERTOLAMI, M.C., HIRATA, R.D.C. Apo B gene haplotype is associated with lipid profile of higher risk for coronary heart disease in Caucasian Brazilian men. **J Clin Lab Anal**, New York, v.15, p.19-24, 2001.
- MAITLAND-VAN DER ZEE, A-H; KLUNGEL, OH; STRIECKER, BHC; VERSCHUREN, WMM; KASTELEIN, JJP; LEUFKENS, HGM; BOER, A. Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. **Atherosclerosis**, Limerick, v.163, p.213-22, 2002.
- MALLINOWSKI, J.M. Atorvastatin: A hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. **Am J Syst Pharm**, Bethesda, v. 55, p. 22253-67, 1998
- MARKS, D.; THOROGOOD, M.; NEIL, A.W.; HUMPHRIES, S.E. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Limerick, vol. 168, p. 1-4, 2003.
- MARMOT, M.G.; BOSMA, H.; HEMINGWAY, H et al., Contribution of job control and other risk factors to social variations in coronary heart disease incidence. **Lancet**, London, v.350, p. 235-9, 1997.
- MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R.B. Polymorphisms in human *MDR1* (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v. 75, n.1, p.13-33, 2004.
- MEISEL, C; ROOTS, I; CASCORBI, I; BRINKMANN, U; BROCKMÖLLER, J. How to manage individualized drug therapy: application of pharmacogenetic knowledge of drug metabolism and transport. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v. 38, n. 9, p. 869-76, 2000.
- MICKLEY, I.A.; JONG-SEOK, L.; WENG, Z.; ZHAN, Z.; ALVAREZ, M.; WILSON, W.; BATES, S.E.; FOJO, T. Genetic polymorphism in MDR-1: A tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. **Blood**, New York, v. 91, n.5, p.1749-56, 1998.
- MORYA, Y.; NAKAMURA, T.; HORINOUCHE, M.; SAKAEDA, T.; TAMURA, T.; NOBUO, A.; SHIRAKAWA, T.; GOTOH, A.; FUJIMOTO, S.; MATSUO, M.; KASUGA, M.; OKUMURA, K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. **Biol Pharm Bull**, Tokyo, v. 25, n.10, p.1356-9, 2002.
- NAKAMURA, T.; SAKAEDA, T.; HORINOUCHE, M.; TAMURA, T.; AOYAMA, N.; SHIRAKAWA, T.; MATSUO, M.; KASUGA, M.; OKUMURA, K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. **Clin Pharmacol Ther**, St. Louis, v.71, n.4, p.297-303, 2002.

- NEATON, J.D., WENTWORTH, D. for the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease: Overall findings and differences by age for 316099 white men. **Arch Intern Med**, Chicago, v.152, p. 56-64, 1992.
- NCEP: National Cholesterol Education Program – Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, Chicago, , v.285, n.19, p.2486-97, 2001.
- OLSSON, AG; ISTAD, H; LUURILA, O, *et al.* Effects of rosuvastatin and atorvastatin compared over 52 weeks of treatment in patients with hypercholesterolaemia. **Am Heart J**, St. Louis, v.144, p.1044-51, 2002.
- ORAM, J.F., LAWN, R.M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. **J Lipid Res**, New York, v.42, p.1173-1179, 2001.
- PRUEKSARITANONT, T; SUBRAMANIAN, R; FANG, X; MA, B; QIU, Y; LIN, JH; PEARSON, PG; BAILLIE, TA. Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization. **Drug Metab Disp**, Bethesda, v. 30, n.5, p.505-12, 2002.
- PRUEKSARITANONT, T. –oxidation of simvastatin in mouse liver preparations. **Drug Metab Disp**, Bethesda, v. 29, n.10, p.1251-5, 2001.
- REDDY, S. Cardiovascular disease in developing countries: dimensions, determinants, dynamics and directions for public health action. **Public Health Nutr**, Wallingford, v.5, p.231-7, 2002.
- RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII and B in serum. **Clin Chem**, Baltimore, v. 32, p.957-61, 1986.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update . **N Engl J Med**, Boston, v. 314, p. 488-500, 1986.
- ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 340, p. 115, 1999.
- ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 2nd ed. Boston: PWS, 1986. p.579.
- 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.

- SAKAEDA, T.; NAKAMURA, T.; OKUMURA, K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Biol Pharm Bull**, Tokyo, v. 25, n. 11, p. 1391-400, 2002.
- 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**, Washington, v. 44, p. 1748-50, 1998.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., GIANNINI, S.D., FORTI, N., DIAMENT, J., ISSA, J.S., HIRATA, R.D.C. Effects of *Ava* II and *Hinc* II polymorphisms at the LDL receptor gene on serum lipid levels of Brazilian individuals with high risk of coronary heart disease. **J Clin Lab Anal**, New York, v. 13, p. 251-8, 1999.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M. H., FORTI, N., DIAMENT, J., GIANNINI, S.D., ISSA, J.S., HIRATA, R.D.C. *Pvu* II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 293, p. 75-88, 2000a.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M. H., GIANNINI, FORTI, N., DIAMENT, J., LIMA, T.M., HIRATA, R.D.C. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 300, p. 139-149, 2000b.
- SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., HIRATA, R.D.C. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor da LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **Rev Bras Anal Clin**, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.195-199, 2000c.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.43-7.45a.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.9-7.12b.
- SZAKACKS, G; OZVEGY, C; BAKOS, E; SARKADI, B; VARADI, A. Transition-state formation in ATPase negative mutants of the human MDR1 protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 3, p. 1314-19, 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**, London, v. 344, p.1383-1389, 1994.

- SCHAEFFELER, E.; EICHELBAUM, M. BRINKMAN, U. e cols. Frequency of C3435T polymorphism in MDR1 gene in African people. **Lancet**, London, v. 358, p. 383-4, 2001
- SCHEUNER, M.T. Genetic evaluation for coronary artery disease. **Genetics in Medicine**, vol. 5, n. 4, p.268-85, 2003.
- SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv Drug Delivery Rev**, Amsterdam, v. 55, p. 3-29, 2003.
- SCHMITZ, G; DROBNIK, W. Pharmacogenomics and Pharmogenetics of cholesterol-lowering therapy. **Clin Chem Lab Med**, 41 (3):581-9, 2003.
- SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; FROMM, M. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v.43, p. 285-307, 2003.
- SCOTO, K.W. Trnscriptional regulation of ABC drug transportes. **Oncogene** 22: 7496-7511, 2003.
- 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.
- SHIMOKATA, K.; YAMADA, Y.; TAKAHISHA, K.; ICHIHARA, S.; IZAWA, H.; NAGATA, K.; MUROHARA, T.; OHNO, M.; YOKOTA, M. Association of gene polymorphisms with coronary artery heart disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Limerick, vol. 172, p. 167-173, 2004.
- SIEDEL, J.; *et al.* AACC Meeting Abstract 34. **Clin Chem**, Washington, v. 39, p. 1127, 1993.
- SIMONS, L.D. Interrrelations of lipid lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. **Am J Cardiol**, New York , v. 27, p. 50-106, 1986.
- SIEST, G; FERRARI, L; ACCAOUCI, M-J, BATT,A-M, VISVIKS, S. Pharmacogenomics of drugs affecting the cardiovascular system. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v. 41, n. 3, p.590-9, 2003.
- STAMLER, J. WENTWORTH, D., NEATON, J.D. Is relationship between cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded. **JAMA**, Chicago, v. 256, p. 2823-8, 1986.

- STEIMER, W.; POTTER, J.M. Pharmacogenetic screening and therapeutic drugs. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 315, p.137-55, 2002.
- STEIN, O., THIERY, J.; STEIN, Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? **Atherosclerosis**, Limerick, v.60, p.1-10, 2002.
- SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H.; IRIE T. *et al.* Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. **Clin Chem**, Washington, v. 41, p. 717-23, 1995.
- SUN, H.; DAI, H.; SHAIK, N.; ELMQUIST, W.F. Drug efflux transporters in CNS. **Adv Drug Delivery Rev**, Amsterdam, v. 55, p. 83-105, 2003.
- The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Mortality rates after 10,5 years for the participants in the MRFIT. Findings related to a priori hypothesis of the trial. **JAMA**, Chicago, v. 263, p. 1795-801, 1990.
- TESSNER, G.; STENSON, W.F.; Overexpression of MDR1 in na Intestinal cell line results in incresed cholesterol uptake from micelles. **Bichim Biophys Res Comm**, New York, v. 267, p. 565-71, 2000.
- TOKUNAGA, K., NAKAMURA, Y.; SAKATA, K.; FUJIMORI, K.; OHKUBO, M.; SAWADA, K.; SAKIYAMA, S. Enhanced expression of a gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancer. **Cancer Res**, Chicago, v. 47, p. 5616-9, 1987
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with na alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, London, v. 6, p. 24-7, 1969.
- VAUGHAN, C.J., GOTTO, A. M.; BASSON, C.T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, New York, v. 35, n. 1, p.1-10, 2000.
- WROBLEWSKI, F.; LA DUE, J. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v. 91, p. 569, 1956.
- YIP, A.G; MA, Q.; WILCOX, M.; PANHUYSEN, C.I.; FARRELL, J.; FARRER, L.A.; WYSZYNSKI, D. Search for genetic factors predisposing to atherogenic dyslipidemia. **BMC Genetics**, London, v. 4, Suppl I, p.S100, 2003.
- YUSUF, S.; REDDY, S.; OUNPUU, S.; ANAND, S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II. Variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. **Circulation**, Dallas, v. 104, p. 2855-64, 2001.

8. Anexos

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente N° ----- Iniciais do Paciente-----

“Avaliação da influência de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na metabolização de fármacos, na resposta terapêutica de indivíduos hipercolesterolêmicos, tratados com vastatinas”

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, história clínica e o exame físico serão realizados. 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, noventa 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.*

ANEXO 2:

Aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
SISTEMA DE SAÚDE INTEGRADO
INSTITUTO "DANTE PAZZANESE" DE CARDIOLOGIA

Av. Dante Pazzanese, 500 (Heliportaria) - Cx. Postal, 215 - São Paulo.
Telefone: 5085-4000

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data da Aprovação: 07 de agosto de 2001

Título do Protocolo: "Avaliação da influência de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na metabolização de fármacos, na resposta terapêutica de indivíduos hipercolesterolêmicos, tratados com estatinas"

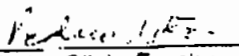
Nomes dos Investigadores: Dr. Marcelo Bertolami e Prof^a. Dr^a. Rosario D. C. Hirata

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia avaliou o Emenda 1 Protocolo do Estudo "Avaliação da influência de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na metabolização de fármacos, na resposta terapêutica de indivíduos hipercolesterolêmicos, tratados com estatinas", e a Emenda 1 do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em 07/agosto/2001 e o aprovou.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa

	Cargo
Dr. Pedro Silvio Farsky	Presidente
Enfermeira Fernanda Anajas Caldas Farias	Secretária
Dra. Claudia Gravina Taddei	Membro Efetivo
Dra. Clarisse Ogawa Índio do Brasil	Membro Efetivo
Dr. João Manoel Rossi Neto	Membro Efetivo
Enfermeira Ana Aparecida Sanches Bersusa	Membro Efetivo
Engenheiro Eddie Luis Alonso Júnior	Membro Efetivo
Sr. Peterney Neves da Silva	Membro Efetivo



Dr. Pedro Silvio Farsky
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CRM: 55.073

ANEXO 3:

Aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 31

São Paulo, 05 de maio de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).

Ivanise Marina Moretti Rebecchi

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de abril p.passado, **aprovou** o projeto "Estudo de genes de resistência envolvidos na resposta terapêutica a vastatinas", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembrando que, como é norma deste CEP exigir, em todos os projetos de pesquisa sujeitos à análise, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido acessível, claro e preciso, bem como declaração de uso exclusivo do material, ambos inexistentes no trabalho, recomendamos que sejam atendidas as exigências acima referidas, ante a probabilidade de o trabalho já estar concluído.

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

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Rosário Domingues Crespo Hirata
FBC

Anexo 4:

Tabela 20. Concentrações séricas basais de lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) entre indivíduos brancos com hipercolesterolemia primária portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos G2677T/A		
	GG (17)	GT+TT+GA+TA (37)	<i>P</i> *
Colesterol total	275 ± 28	290 ± 46	0,191
Triacilgliceróis	177 ± 65	189 ± 80	0,273
HDL-C	49 ± 12	52 ± 15	0,727
LDL-C	190 ± 28	201 ± 43	0,527
VLDL-C	35 ± 13	38 ± 16	0,584
ApoA _I	122 ± 19	123 ± 24	0,768
ApoB	145 ± 14	140 ± 22	0,472

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoA_I: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Tabela 21. Concentrações séricas basais de lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) entre indivíduos negros com hipercolesterolemia primária portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo G2677T/A do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos G2677T/A		P*
	GG (11)	GT+TT+GA+TA (11)	
Colesterol total	307 ± 42	287 ± 42	0,278
Triacilgliceróis	124 ± 47	134 ± 30	0,547
HDL-C	64 ± 15	60 ± 15	0,499
LDL-C	218 ± 34	200 ± 35	0,246
VLDL-C	25 ± 9	27 ± 6	0,379
ApoA _I	128 ± 19	132 ± 24	0,653
ApoB	140 ± 24	140 ± 21	0,953

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoA_I: apolipoproteína A_I e apoB: apolipoproteína B. *teste t de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Anexo 5:

Tabela 22. Concentrações séricas basais de lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) entre indivíduos brancos com hipercolesterolemia primária portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos C3435T		<i>P</i> *
	CC (16)	CT+TT (38)	
Colesterol total	276 ± 28	290 ± 46	0,316
Triacilgliceróis	170 ± 64	192 ± 80	0,325
HDL-C	52 ± 16	50 ± 13	0,700
LDL-C	190 ± 26	201 ± 44	0,412
VLDL-C	34 ± 13	38 ± 16	0,323
ApoA _I	126 ± 26	121 ± 21	0,404
ApoB	141 ± 16	142 ± 21	0,861

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoA_I: apolipoproteína A_I e apoB: apolipoproteína B. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logaritmica.

Anexo 6:

Tabela 23. Variação relativa na concentração dos lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) após a administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária do sexo masculino agrupados segundo os genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos C3435T		P*
	CC (7)	CT+TT (18)	
Colesterol total	-0,34 ± 0,09	-0,27 ± 0,09	0,100
Triacilgliceróis	-0,25 ± 0,16	-0,23 ± 0,22	0,767
HDL-C	+0,02 ± 0,14	-0,03 ± 0,10	0,317
LDL-C	-0,43 ± 0,10	-0,34 ± 0,13	0,103
VLDL-C	-0,26 ± 0,16	-0,26 ± 0,21	0,996
ApoAI	0,00 ± 0,12	+0,06 ± 0,11	0,262
ApoB	-0,32 ± 0,10	-0,24 ± 0,13	0,153

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. *teste t de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Tabela 24. Variação relativa na concentração dos lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) após a administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária do sexo feminino agrupados segundo os genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)	Genótipos C3435T		P*
	CC (7)	CT+TT (18)	
Colesterol total	-0,28 ± 0,13	-0,31 ± 0,09	0,199
Triacilgliceróis	-0,14 ± 0,23	-0,11 ± 0,24	0,422
HDL-C	+0,03 ± 0,15	+0,02 ± 0,10	0,594
LDL-C	-0,38 ± 0,15	-0,42 ± 0,11	0,344
VLDL-C	-0,15 ± 0,22	-0,11 ± 0,25	0,430
ApoA1	0,02 ± 0,14	+0,00 ± 0,09	0,661
ApoB	-0,32 ± 0,14	-0,31 ± 0,12	0,525

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoA1: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. *teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Anexo 7:**Tabela 25.** Expressão basal e após administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) em pacientes hipercolesterlêmicos primários de acordo com a etnia segundo os genótipos do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*.

C3435T			
	CC	CT+TT	P*
Branços	(25)	(51)	
basal	0,65 ± 0,20	0,54 ± 0,16	0,034
atorvastastina	0,51 ± 0,18	0,55 ± 0,18	0,416
Negros	CC	CT+TT	P*
	(25)	(51)	
basal	0,67 ± 0,27	0,62 ± 0,26	0,660
atorvastastina	0,63 ± 0,24	0,54 ± 0,24	0,383

*teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Anexo 8:

Tabela 26. Expressão basal, após administração de atorvastatina, e variação da expressão do RNAm (média±DP) do gene *MDR1* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos em GI, GI e GIII.

	GI (34)	GII (12)	GIII (30)	P**
Basal	0,706 ± 0,187*	0,577 ± 0,174	0,466 ± 0,161*	<0,001
10 mg de atorvastatina	0,450 ± 0,183*	0,571 ± 0,173	0,654 ± 0,158*	< 0,001
Varição da expressão	-0,360 ± 0,200*	-0,010 ± 0,030*	0,610 ± 0,960*	< 0,001

** ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. *diferenças estatisticamente significantes, segundo o valor de p encontrado.

Anexo 9:

Tabela 27. Expressão basal, após administração de atorvastatina, e variação da expressão do RNAm (média±DP) do gene *MDR1* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos segundo a etnia.

	brancos (54)	negros (22)	<i>P</i> *
Basal	0,570 ± 0,177	0,641 ± 0,259	0,175
10 mg de atorvastatina	0,539 ± 0,176	0,577 ± 0,237	0,440
Variação da expressão	0,03 ± 0,43	0,20 ± 1,26	0,247

*teste *t* de Student, para os parâmetros que não apresentaram distribuição normal foi feita transformação logarítmica.

Anexo 10:**Tabela 28.** Variação relativa na concentração dos lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) após a administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária agrupados segundo a variação da expressão do gene *MDR1* (GI, GII e GIII).

Perfil lipídico	GI (34)	GII (30)	GIII (12)	P**
Colesterol total	-0,321 ± 0,101	-0,279 ± 0,081	-0,280 ± 0,102	0,204
Triacilgliceróis	-0,149 ± 0,228	-0,124 ± 0,264	-0,186 ± 0,225	0,696
HDL-C	+0,028 ± 0,138	+0,016 ± 0,103	+0,012 ± 0,097	0,395
LDL-C	-0,417 ± 0,126	-0,381 ± 0,088	-0,365 ± 0,142	0,267
VLDL-C	+0,205 ± 0,397	+0,282 ± 0,411	+0,293 ± 0,437	0,694
ApoAI	+0,014 ± 0,122	+0,020 ± 0,106	+0,019 ± 0,093	0,977
ApoB	-0,330 ± 0,109*	-0,316 ± 0,082	-0,246 ± 0,149*	0,025

Número de indivíduos entre parêntesis. LDL-C: colesterol de LDL; VLDL-C: colesterol de VLDL; apoAI: apolipoproteína AI e apoB: apolipoproteína B. Sinal (+) indica aumento, sinal (-) indica redução. ** ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. *diferenças estatisticamente significantes, segundo o valor de p encontrado.

Anexo 11:

Tabela 29. Expressão basal, após administração de atorvastatina, e variação da expressão do RNAm (média±DP) do gene *MRP1* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos em P1, P2 e P3.

	P1 (30)	P2 (9)	P3 (37)	P**
Basal	0,815 ± 0,178 ^a	0,824 ± 0,173 ^a	0,621 ± 0,156 ^b	<0,05
10 mg de atorvastatina	0,670 ± 0,178*	0,820 ± 0,178	0,798 ± 0,161*	< 0,05
Variação da expressão	-0,18 ± 0,11*	-0,01 ± 0,04*	0,33 ± 0,30*	< 0,001

** ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. *^{a b} diferenças estatisticamente significantes, segundo o valor de p encontrado.

Anexo 12:**Tabela 30.** Variação relativa na concentração dos lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) após a administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária agrupados segundo a variação da expressão do gene *MRP1* (P1, P2 e P3)

	P1 (30)	P2 (9)	P3 (37)	P*
Colesterol total	-0,300 ± 0,096	-0,344 ± 0,088	-0,285 ± 0,104	0,273
Triacilgliceróis	-0,154 ± 0,237	-0,149 ± 0,178	-0,166 ± 0,241	0,822
HDL-C	+0,008 ± 0,139	+0,066 ± 0,114	-0,001 ± 0,098	0,316
LDL-C	-0,393 ± 0,119	-0,433 ± 0,114	-0,379 ± 0,140	0,523
VLDL-C	-0,154 ± 0,239	-0,149 ± 0,185	-0,180 ± 0,240	0,667
ApoA1	0,022 ± 0,130	-0,026 ± 0,104	0,025 ± 0,096	0,467
ApoB	-0,317 ± 0,095	-0,324 ± 0,121	-0,269 ± 0,149	0,255

* ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Anexo 12:**Tabela 30.** Variação relativa na concentração dos lipídeos e apolipoproteínas (média±DP) após a administração de atorvastatina (10mg/d/4sem) nos indivíduos com hipercolesterolemia primária agrupados segundo a variação da expressão do gene *MRP1* (P1, P2 e P3)

	P1 (30)	P2 (9)	P3 (37)	P*
Colesterol total	-0,300 ± 0,096	-0,344 ± 0,088	-0,285 ± 0,104	0,273
Triacilgliceróis	-0,154 ± 0,237	-0,149 ± 0,178	-0,166 ± 0,241	0,822
HDL-C	+0,008 ± 0,139	+0,066 ± 0,114	-0,001 ± 0,098	0,316
LDL-C	-0,393 ± 0,119	-0,433 ± 0,114	-0,379 ± 0,140	0,523
VLDL-C	-0,154 ± 0,239	-0,149 ± 0,185	-0,180 ± 0,240	0,667
ApoA1	0,022 ± 0,130	-0,026 ± 0,104	0,025 ± 0,096	0,467
ApoB	-0,317 ± 0,095	-0,324 ± 0,121	-0,269 ± 0,149	0,255

* ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.